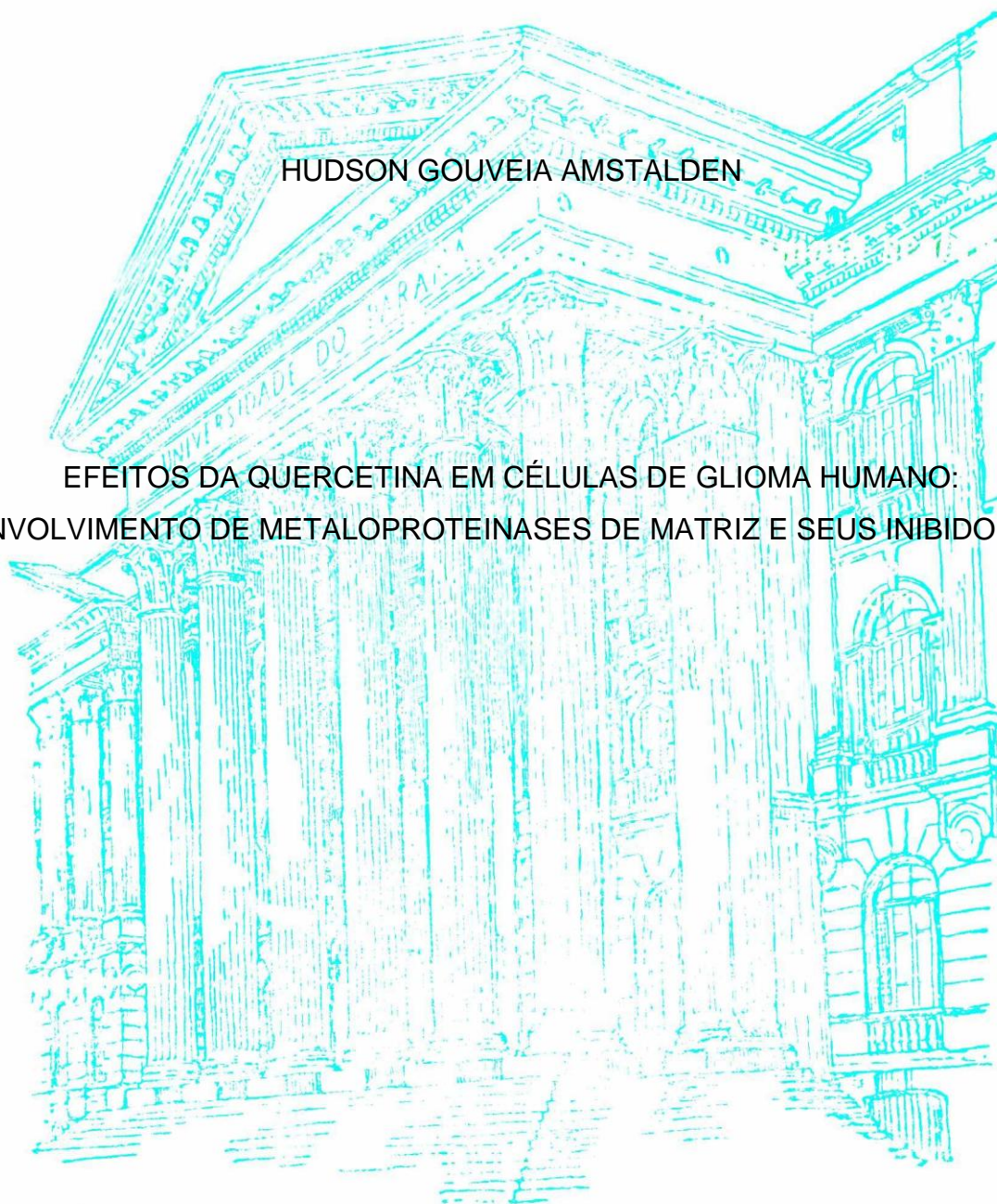


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HUDSON GOUVEIA AMSTALDEN

EFEITOS DA QUERCETINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO:  
ENVOLVIMENTO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES



CURITIBA

2011

HUDSON GOUVEIA AMSTALDEN

EFEITOS DA QUERCETINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO:  
ENVOLVIMENTO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Sheila M. B. Winnischofer

Co-orientadora: Profa. Dra. Glaucia R. Martinez

CURITIBA

2011

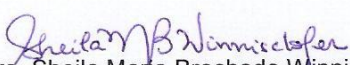
## TERMO DE APROVAÇÃO

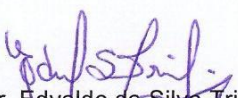
HUDSON GOUVEIA AMSTALDEN


### EFEITOS DA QUERCETINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO: ENVOLVIMENTO DE METALOPROTEASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica) no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

  
Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular e Molecular, UFPR

  
Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

Curitiba, 18 de fevereiro de 2011.

*A Alex Ângelo Teodorico (em memória),  
e a todos os pequeninos da Hemato-Oncologia do HPP.*

## **Agradecimentos**

\*\*\*

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Sheila Winnischofer, pela orientação, paciência, dedicação, amizade e entusiasmo. Muito obrigado.

À Profa. Dra. Glaucia Martinez, pela co-orientação deste trabalho, conselhos e dedicação.

Às professoras do Núcleo de Estudos em Bioenergética e Bioquímica de Fármacos e Xenobióticos, pela dedicação, empenho e carinho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, principalmente à Profa. Dra. Rose Adele Monteiro por me apresentar a Bioquímica e despertar meu interesse para a “Química da vida”.

Aos colaboradores diretos deste trabalho, Dra. Mari Sogayar (IQ-USP), Thiago Jacomasso (BQ-UFPR), Marina Lima (IQ-USP), Juliana Kenski (BQ-UFPR), Reginaldo Sene (GENÉTICA-UFPR).

Aos colegas de laboratório, que estavam o tempo todo dispostos a ajudar, em especial: Elizabeth Cunha, Andréia Suzukawa, Alex Amaral, Glaucio Valdameri, Fernanda Barbosa, Paulo Worfel, Caroline Valente, Gisele Arruda, Carolina Farias, Anna Brandt, Carina Scoparo e Juliana Amorim. Muito obrigado pelas risadas, conversas, protocolos e ótimos momentos.

À minha turma de mestrado, particularmente aos parceiros Geison Cambri, Luis Filipe Guimarães, Rafael Chiesorin pelos créditos, seminários e muitos cafés.

À comissão organizadora do I Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, foi muito bom trabalhar com vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) UFPR.

Ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo apoio institucional e disponibilidade de uso dos equipamentos.

A CAPES/REUNI pelo auxílio.

\*\*\*

Ao Alexandre Malinowski, por ser meu amigo em todas as horas, muito obrigado piá...

À Inajara Rotta, amada, obrigado estar em minha vida...

Ao Lucas Rodrigues, grande coração...

Ao Reginaldo Sene, além de colaborar com este trabalho, sou grato por sua amizade...

Ao Renee Volpato Viaro, parceirão, amigo. Obrigado...

A minha família, meu pai Osvaldo Amstalden, minha mãe Miralva G. Amstalden, minha irmã Vagnéia G. Amstalden e meu sobrinho Murilo Amstalden F. dos Santos, obrigado por me apoiarem...Amo vocês.

*“Não pode haver, entretanto, a mínima dúvida de que os organismos superiores, como são agora formados, contenham dentro de si as origens da morte.”*

Friedrich Leopold August Weismann, filósofo de biologia, 1889

## RESUMO

O processo invasivo é uma característica importante de diversas neoplasias malignas, relacionado diretamente com o prognóstico dos pacientes. O estabelecimento da invasão celular inclui a capacidade das células em remodelar o espaço extracelular. Os gliomas possuem essa característica, e devido à complexidade anatômica desse tecido a média de sobrevida para pacientes com o grau mais agressivo desse tipo de tumor (grau IV) é de 12 – 15 meses. A invasividade, em geral, é facilitada pela ação das metaloproteases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular, favorecendo a invasão. Entre os elementos que podem regular a atividade de MMPs está RECK, uma glicoproteína ancorada à membrana celular. A quercetina, um flavonóide de ocorrência natural na dieta, possui a propriedade de inibir a atividade de MMPs, e desta forma tem potencial para a terapêutica anti-tumoral ou ação quimioprotetora. Neste trabalho foi avaliado o efeito da quercetina em células de glioma humano (U373MG e U87MG) em relação aos processos de viabilidade, proliferação, morte e migração celular, correlacionando com os níveis de RNAm de *RECK* (e seus transcritos alternativos de *splicing*), *MMPs* e *TIMPs* e aos processos de viabilidade, proliferação, morte e migração celular. Foi verificado (por coloração com cristal violeta e análises de citometria de fluxo) que o tratamento das células U373MG e U87MG com quercetina promoveu a diminuição da proliferação celular de maneira dose e tempo dependente. Especificamente, o tratamento destas células com 50 µmol/L de quercetina por 48h promoveu um aumento do número de células na fase G1 do ciclo celular e diminuição de células na fase G2-M. O aumento de ambas as linhagem na fase G1 pelo flavonóide não foi acompanhado de morte celular, indicando que o tratamento com quercetina em baixas doses promove parada de proliferação celular. A análise dos perfis de expressão gênica foi investigada através de ensaios de PCR quantitativo em Tempo Real. Os resultados indicaram que o tratamento com quercetina levou a uma diminuição na expressão dos transcritos alternativos de *RECK* (*RECK B* e *D*) e não ocorreu modulação no transcrito canônico *RECK A*. Quanto a *MMP 2*, o tratamento regulou negativamente os níveis deste transcrito, resultado que foi confirmado com a inibição da atividade da enzima *MMP 2* pela quercetina tanto na linhagem U87MG quanto na U373MG. Os níveis dos transcritos de *TIMP 1* e *TIMP 2* aumentaram significativamente após o tratamento com quercetina nas células U87MG. Nas células U373MG ocorreu um aumento em *TIMP 1* e uma diminuição em *TIMP 2*. Em conjunto, nossos resultados indicam que o tratamento com quercetina é capaz de reduzir a proliferação de células de gliomas, levando à parada de ciclo celular em G1 e à diminuição da migração, e sugerem que o gene *RECK* e seus transcritos alternativos possam ser alvos moleculares importantes modulados por quercetina capazes de contribuir para os efeitos benéficos deste flavonóide.

Palavras-chave: RECK. MMPs. Gliomas. Quercetina.



## ABSTRACT

The invasive process is an important feature of several malignant cancers, related directly to the patients' prognosis. The establishment of cell invasion include the ability of cells to remodel the extracellular space. Gliomas have this characteristic and because of the anatomical complexity of this tissue, the median survival for patients with more aggressive degree of this type of tumor (grade IV) is 12 - 15 months. The invasivity, in general, is facilitated by the action of matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the extracellular matrix, favoring the invasion. Among the factors that may regulate the activity of MMPs there's RECK, a glycoprotein anchored to the cell membrane. Quercetin, a flavonoid naturally occurring in the diet, has the property of inhibiting the MMPs' activity, and thus has the potential for anti-tumor therapy or chemoprotective action. This study evaluated the effect of quercetin in human glioma cells (U373MG and U87MG) in relation to mRNA levels of RECK (and its alternative transcripts), MMPs and TIMPs and to the processes of viability, proliferation, death and cell migration. Been established (by violet crystal staining and flow cytometry analysis) that treatment of U87MG and U373MG cells with quercetin caused a decrease in cell proliferation in a dose and time dependent way. Specifically, treatment of these cells with 50  $\mu\text{mol/L}$  of quercetin for 48 hours caused cell arrest in G1 phase of cell cycle and decrease of cells in G2-M phase. The increase in both lines in G1 phase by the flavonoid was not accompanied by cell death, indicating that treatment with quercetin at low doses promotes arrest of cell proliferation. The analysis of gene expression profiles was investigated by quantitative RT-PCR. The results indicated that treatment with quercetin led to a decrease in the expression of alternative transcripts of RECK (RECK B and D) and no modulation in the canonical transcript RECK A. As for MMP 2, the treatment downregulated the levels of this transcript, a result that was confirmed with the inhibition of MMP 2 activity by quercetin both in U87MG cell line as in U373MG. The levels of the transcripts of TIMP 1 and TIMP 2 were significantly increased after treatment with quercetin in U87MG cells. In U373MG cells happened an increase in TIMP 1 and a decrease in TIMP 2. Taken together, our results indicate that treatment with quercetin is able to reduce the proliferation of glioma cells, leading to cell cycle arrest in G1 and a migration decrease, and suggest that the RECK gene and its alternative transcripts may be important molecular targets modulated by quercetin able to contribute to the beneficial effects of this flavonoid.

Key-words: RECK. MMPs. TIMPs. Quercetin.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SINALIZAÇÃO PRÓ-SOBREVIVÊNCIA EM GLIOBLASTOMAS.....	24
FIGURA 2 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE MMPS.....	32
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA PROTEINA RECK .....	35
FIGURA 4 – MODELO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPS POR RECK .....	36
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>RECK</i> .....	41
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTÉICOS CODIFICADOS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>RECK</i> .....	42
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA .....	44
FIGURA 8 – MODELO DE ABSORÇÃO DA QUERCETINA NO INTESTINO DELGADO.....	46
FIGURA 9: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS U373MG, U343MG e U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA .....	72
FIGURA 10: ANÁLISE DE CICLO CELULAR U373MG.....	75
FIGURA 11: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U373MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR. ....	76
FIGURA 12: ANÁLISE DE CICLO CELULAR U87MG.....	77
FIGURA 13: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR.....	78
FIGURA 14: ANÁLISE DE MORTE CELULAR U373MG.....	81
FIGURA 15: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U373MG EM CADA QUADRANTE ANALISADO APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	82
FIGURA 16: ANÁLISE DE MORTE CELULAR U87MG.....	83
FIGURA 17: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG EM CADA QUADRANTE ANALISADO APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	84
FIGURA 18: ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DAS CÉLULAS U87MG E 373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	86
FIGURA 19: ENSAIO DE <i>SCRATCH</i> DA LINHAGEM U373MG.....	88
FIGURA 20: GRÁFICO RELATIVO AO ENSAIO DE <i>SCRATCH</i> DA LINHAGEM U373MG.....	89
FIGURA 21: ENSAIO DE <i>SCRATCH</i> DA LINHAGEM U87MG.....	91
FIGURA 22: GRÁFICO RELATIVO AO ENSAIO DE <i>SCRATCH</i> DA LINHAGEM U87MG.....	92

FIGURA 23: RNA TOTAL EXTRAÍDO DA LINHAGEM U373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	93
FIGURA 24: PAINEL DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM U373MG FRENTE AO TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	94
FIGURA 25: RNA TOTAL EXTRAÍDO DA LINHAGEM U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	96
FIGURA 26: PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM U87MG FRENTE AO TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	97
FIGURA 27: PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS LINHAGENS U373MG <i>VERSUS</i> U87MG.....	99
FIGURA 28: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM U373MG.....	101
FIGURA 29: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM U87MG.....	102
FIGURA 30: ZIMOGRFIA GELATINOSA DA LINHAGEM U373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	104
FIGURA 31: ZIMOGRFIA GELATINOSA DA LINHAGEM U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	105
FIGURA 32: ATIVIDADE DE MMP 2 U373MG <i>VERSUS</i> U87MG.....	106
FIGURA 33 – PROPOSTA DE MODELO DE REGULAÇÃO DA QUERCETINA SOBRE RECK A, RECK B, TIMP 1 E MMPs EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO.....	117

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DE QUERCETINA EM DIFERENTES FONTES.....	43
TABELA 2 – ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE DA QUERCETINA.....	47
TABELA 3- COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO PARA SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR.....	65
TABELA 4 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR.....	66
TABELA 5 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	73
TABELA 6 – FASES DO CICLO CELULAR QUE OCORRERAM AUMENTO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACS – “*American Cancer Society*”

ANOVA – Análise de Variância

ASCO – “*American Society of Clinical Oncology*”

cDNA – DNA complementar (à um mRNA)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxiribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGF – Fator de crescimento epidermal

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma multiforme

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HPRT – Hipoxantina Fosforibosil Transferase

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteases

mRNA – RNA mensageiro

MTIC – Metiltiazenoimidazolcarboxamida

MT-MMP – Metaloprotease de membrana

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RECK – “*Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs*”

RNA – Ácido Ribonucleico

RT- qPCR – PCR em Tempo-Real

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SPI – Domínio com atividade inibidora de serino proteases

SNPs – “*Single nucleotide polymorphisms*”

TIMPs – Inibidores teciduais de Metaloproteases

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	20
2.1 Células da glia	20
2.2 Gliomas	21
2.2.1 Os tumores da glia	21
2.2.2 Vias de sinalização das cascatas pró-sobrevivência em glioblastomas	22
2.2.2.1 Sinalização entre o Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e o receptor Tirosina quinase (RTK)	23
2.2.2.3 Sinalização entre o Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e Ras	25
2.2.2.4 Sinalização de p53	25
2.2.2.5 Sinalização de pRB (proteína do retinoblastoma)	27
2.2.3 Sintomas, Diagnóstico e Tratamento	28
2.3 MATRIZ EXTRACELULAR E METALOPROTEASES	30
2.3.1 MEC: estrutura e função	30
2.3.2 Metaloproteases de matriz e seus inibidores teciduais	31
2.3.3 MMPs e Gliomas	33
2.4 RECK: UM INIBIDOR DE MMPs	34
2.4.1 Estrutura de RECK	34
2.4.2 Funções de RECK	35
2.4.3 Regulação de <i>RECK</i>	38
2.4.3.1 <i>RECK</i> e <i>Ras</i>	38
2.4.3.1 Outras formas de regulação de <i>RECK</i>	40
2.4.4 Transcritos alternativos de <i>RECK</i>	40
2.5 QUERCETINA	42
2.5.1 Propriedades químicas da quercetina	43
2.5.2 Farmacocinética da quercetina	44
2.5.3 Quercetina e Câncer	48
2.5.4 Quercetina e MMPs	52
<b>3 OBJETIVOS</b>	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
<b>4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	55
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	56

5.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR .....	56
5.1.1 Esterilização dos materiais.....	56
5.2 SOLUÇÕES, MEIO DE CULTURA E LINHAGENS CELULARES .....	56
5.2.1 Solução salina fosfato tamponada A (PBSA) .....	56
5.2.2 Solução de tripsina-EDTA .....	56
5.2.3 Solução de quercetina.....	57
5.2.4 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI).....	57
5.2.5 Solução de iodeto de propídeo não desnaturante .....	57
5.2.6 Tampão de ligação Anexina V- FITC .....	58
5.2. Meio de cultura .....	58
5.2.5 Linhagens celulares .....	58
5.2.6 Condições de cultivo .....	58
5.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	59
5.3.1 Curva de tratamento: método do cristal violeta .....	59
5.4 ENSAIO PARA ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	60
5.4.1 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.....	60
5.5 ENSAIO PARA ANÁLISE DA MORTE CELULAR.....	61
5.5.1 Análise de morte celular por citometria de fluxo.....	61
5.5 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO.....	61
5.5.1 Método do cristal violeta.....	61
5.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR .....	62
5.6.1 Ensaio de <i>Scratch in vitro</i> .....	62
5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>RECK</i> (E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) <i>TIMPs</i> E <i>MMPs</i> .....	63
5.7.1 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com quercetina.....	63
5.7.1.1 Extração e purificação do RNA celular .....	63
5.7.1.2 Síntese de cDNA.....	64
5.7.1.3 Avaliação da modulação da expressão gênica .....	65
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES (MMPs) .....	67
5.8.1 Zimografia gelatinosa .....	67
5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	67
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
6.1 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA .....	69



6.1.1 Proliferação celular – U373MG .....	69
6.1.2 Proliferação celular – U343MG .....	70
6.1.3 Proliferação celular – U87MG .....	70
6.1.4 Comparação da proliferação entre as linhagens de glioma analisadas .....	71
6.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	73
6.2.1 Análise do ciclo celular – U373MG.....	74
6.2.2 Análise do ciclo celular – U87MG.....	76
6.2.3 Comparação da análise de ciclo celular – U373MG e U87MG .....	78
6.3 ANÁLISE DA MORTE CELULAR.....	79
6.3.1 Morte celular – U373MG .....	80
6.3.2 Morte celular – U87MG .....	82
6.3.3 Comparação entre as duas linhagens.....	83
6.4 ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO .....	85
6.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR .....	87
6.5.1 Ensaio de <i>Scratch in vitro</i> – U373MG.....	87
6.5.1 Ensaio de <i>Scratch in vitro</i> – U87MG .....	89
6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DE <i>RECK</i> (E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) <i>TIMPs</i> E <i>MMPs</i> APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA..	92
6.6.1 Análise dos níveis de mRNA nas células U373MG .....	92
6.6.2 Análise dos níveis de mRNA – U87MG.....	95
6.6.3 Comparação dos dados obtidos U373MG e U87MG .....	98
6.6.4 Quantificação comparativa dos níveis de mRNA das linhagens U373MG e U87MG .....	99
6.6.5 Análise da Razão Inibidores/MMPs.....	100
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES (MMPs) .....	103
6.7.1 Zimografia U373MG .....	103
6.7.2 Zimografia U87MG .....	104
6.7.3 Comparação atividade de MMP 2 entre as linhagens .....	106
<b>7 DISCUSSÃO FINAL .....</b>	<b>107</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os gliomas são neoplasias do sistema nervoso central. Dentre eles o glioblastoma (GBM) é um dos mais freqüentes e mais devastadores. Cirurgia seguida de radioterapia com quimioterapia adjuvante com temozolomida é o padrão de tratamento em pacientes com GBM, no entanto o prognóstico continua ruim, com uma média de sobrevida de 12 – 15 meses (MINNITI et al., 2009). Anormalidades genéticas do glioblastoma estão associadas com a ativação patológica ou supressão de vias de transdução de sinais intracelulares (VERMA, 2009; KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010).

Uma das características importantes dos gliomas malignos é a sua alta invasividade, o fenótipo agressivo dessas células torna muito desafiador o problema clínico desta neoplasia. Em pacientes que foram submetidos à cirurgia foi demonstrado que mesmo retirando a massa tumoral podem ocorrer recidivas devido ao desprendimento de algumas células tumorais e invasão do tecido normal adjacente. Um importante grupo de enzimas, as metaloproteases (MMPs), foram relacionadas ao processo de invasão em quase todos os tipos de tumores, incluindo os gliomas. As MMPs têm sido apontadas como alvos promissores para a terapia do câncer, com base na sua regulação e capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (DEMUTH e BERENS, 2004).

Entre as moléculas que podem diminuir os níveis destas MMPs está RECK, uma glicoproteína ancorada a membrana através de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MENG et al., 2008). RECK pode agir através da inibição da secreção ou da inibição direta da atividade enzimática de MMP 2, MMP 9 e MT1-MMP (NODA et al., 2003). Em geral, células normais apresentam níveis elevados de RECK, enquanto células tumorais demonstram níveis diminuídos desta proteína (NODA e TAKAHASHI, 2007). Desta forma, RECK e MMPs podem ser possíveis alvos promissores para a terapêutica farmacológica.

Uma molécula descrita por ter propriedades de inibir as MMPs é a quercetina (ANNABI et al., 2002; LIN et al., 2008; ZHANG, HUANG, XU, 2004). A quercetina é um flavonóide de ocorrência natural na dieta. Faz parte do grupo dos Flavonóis, sendo, a mesma, o flavonóide mais comum desse grupo (ERLUND, 2004). É encontrada em uma grande gama de vegetais, frutas e bebidas como o chá e

vinhos. Entre seus inúmeros efeitos benéficos para a saúde humana estão: antioxidante, anti-inflamatório, anti-coagulante, antibiótico, anti-hipertensivo, inibidor da agregação plaquetária e ação antitumoral (BISCHOFF, 2008; ERLUND, 2004; BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

Em gliomas, a quercetina foi capaz de reduzir a proliferação e viabilidade celular, provocou morte celular por apoptose e necrose e promoveu um aumento do número de células na fase G1 no ciclo celular. O flavonóide também foi capaz de diminuir a proliferação celular de maneira dose dependente (BRAGANHOL et al., 2006; KIM et al., 2008).

Levando em consideração que RECK é uma proteína supressora da invasividade e está envolvida na regulação de MMPs, e a quercetina atua inibindo as metaloproteases por mecanismos ainda não bem esclarecidos e que os gliomas possuem um fenótipo altamente invasivo, o objetivo central do projeto é avaliar a ação da quercetina nos processos de proliferação e migração celular em modelo de glioma humano, com ênfase na avaliação da modulação dos níveis de expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos de *splicing*, em comparação com os de MMPs e TIMPs (inibidores clássicos de MMPs). Para este fim, serão utilizadas duas linhagens de glioma humano, U373MG e U87MG, tratadas com diferentes concentrações de quercetina. A observação dos efeitos deste flavonóide sobre as células de glioma será feita utilizando técnicas que avaliam proliferação e apoptose, através de ensaios colorimétricos e por citometria de fluxo; análise de migração celular, através do ensaio de *Scratch*; avaliação da expressão de *RECK* e de seus transcritos alternativos, e da expressão de *MMPs* e *TIMPs*, através de ensaios de PCR em tempo real e; e por fim, avaliação da atividade de MMPs por zimografia gelatinosa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Células da glia

O tecido cerebral é constituído por dois componentes principais: (1) os neurônios, células geralmente com grandes prolongamentos, e (2) vários tipos de células da glia ou neuroglia, que sustentam os neurônios e participam de várias outras funções importantes (KRAWCZYK; JAWORSKA-ADAMU, 2010; FREEMAN, 2010). São elas:

**Oligodendrócitos:** produzem a bainha de mielina que servem de isolantes elétricos para os neurônios do sistema nervoso central (SNC). Os oligodendrócitos têm prolongamentos que se enrolam em volta dos axônios, produzindo a bainha de mielina.

**Astrócitos:** são células de forma estrelada, elas apresentam feixes de filamentos intermediários constituídos pela proteína fibrilar ácida da glia, que reforçam a estrutura celular. Os astrócitos ligam os neurônios aos capilares sanguíneos e a pia-mater (uma camada delgada de tecido conjuntivo que reveste o SNC). Dentre as células da glia, os astrócitos são as células mais numerosas e de maior diversidade funcional.

Além da função de sustentação, os astrócitos participam do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular dos neurônios.

**Células epindimárias:** são células epiteliais colunares que revestem os ventrículos do cérebro e o canal da medula espinhal. Em alguns locais as células epindimárias são ciliadas, o que facilita a movimentação do líquido cefalorraquidiano.

**Microglia:** as células da microglia são pequenas e alongadas, com prolongamentos curtos e irregulares. As células da microglia são fagocitárias e derivam dos precursores trazidos da medula óssea pelo sangue, representando o sistema morfonuclear fagocitário no sistema nervoso central.

## 2.2 Gliomas

### 2.2.1 Os tumores da glia

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como gliomas, são um grupo de neoplasias que se originam nas células da glia. Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em glioblastomas (também conhecido como glioblastoma multiforme - GBM), astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. De 10 tumores cerebrais, 4 são gliomas. Considerando somente tumores cerebrais malignos, de cada 10, 7 a 8 são gliomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; MINNITI et al., 2009; VERMA, 2009).

Estimativas para o ano de 2009 feitas pela ACS (American Cancer Society) revelam que cerca de 22.070 novos casos de tumores malignos cerebrais e de medula espinhal foram diagnosticados, destes 12.010 em homens e 10.060 em mulheres. Esses números seriam maiores se os tumores benignos estivessem inclusos na estimativa. Ainda em 2009 cerca de 12.920 pessoas (7.330 – homens; 5.590 – mulheres) foram a óbito em decorrência de tumores malignos de cérebro e medula espinhal. Globalmente a chance de que uma pessoa venha a desenvolver uma neoplasia maligna de cérebro e medula espinhal em seu curso vital é inferior a 1% (cerca de 1 em 150 para homens e 1 em 185 para mulheres). As taxas de sobrevida podem variar muito, dependendo do tipo de tumor, que serão mostrados a seguir.

Os tumores também são classificados de acordo com seu grau de malignidade em uma escala de I a IV (LOUIS et al., 2007). Tumores de grau I são biologicamente benignos e podem ser curados cirurgicamente, se for considerado operado no momento do diagnóstico, já os tumores de grau II, são neoplasias de baixo grau que podem se desenvolver por longo curso clínico, mas não são curáveis cirurgicamente, os tumores de grau III são malignos e podem levar a óbito em poucos anos, os tumores de grau IV são altamente malignos e letais dentro de 9-15 meses (MINNITI et al., 2009; STUPP et al., 2005), 70% dos gliomas grau II podem se transformar em grau III e IV dentro de 5-10 anos do diagnóstico inicial, e em

seguida, se comportam clinicamente como os tumores de alto grau (MAHER et al. 2001).

Dentre os gliomas, os tumores mais comuns são os astrocitomas, cerca de 3 de 10 tumores cerebrais são astrocitomas. Os astrocitomas de baixo grau (pilócítico – grau I, difuso – grau II) possuem um crescimento lento; de grau intermediário (anaplásico – grau III) crescem em um ritmo moderado a acelerado; de grau elevado (glioblastoma multiforme – grau IV) possuem um rápido crescimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY, 2010).

Uma das características mais importantes de gliomas malignos é sua característica invasiva, o fenótipo agressivo dessas células torna muito desafiador o problema clínico dessa neoplasia. Em pacientes que foram submetidos à cirurgia foi demonstrado que mesmo retirando a massa tumoral podem ocorrer recidivas devido ao desprendimento de algumas células tumorais e invasão do tecido normal adjacente (DEMUTH, BERENS, 2004). Um importante grupo de enzimas, as metaloproteases (MMPs), foram relacionadas ao processo de invasão em quase todos os tipos de tumores, incluindo os gliomas. As MMPs têm sido apontadas como alvos promissores para a terapia do câncer com base na sua regulação e capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e facilitar a invasão do tecido (RAO, 2003).

### 2.2.2 Vias de sinalização das cascatas pró-sobrevivência em glioblastomas

Nos glioblastomas, como em outros tipos de neoplasias, ocorre um descontrole dos processos de divisão celular, sobrevivência, invasão celular, angiogênese, entre outros (NELSON; COX, 2005). Dentre estes mecanismos, as cascatas de sinalização pró-sobrevivência das células de glioblastomas chamam a atenção devido ao seu fenótipo de alta resistência (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010; WELLER et al., 2010).

### 2.2.2.1 Sinalização entre o Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e o receptor Tirosina quinase (RTK)

As cascatas de sinalização para a sobrevivência permitem que a célula consiga superar ambientes estressantes e nocivos através da indução da expressão ou disponibilidade de fatores de sobrevivência. Uma via importante de sobrevivência é a cascata da classe de enzimas  $I_A$  fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), essa enzima é responsável pela conversão dos lipídios de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato –  $PIP_2$ , até fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato –  $PIP_3$ , que por sua vez fosforila a proteína AKT, ou proteína quinase B (ENGELMAN, 2009).

EGFRs (receptores para o fator de crescimento epidermal) e PDGFRs (receptores para o fator de crescimento plaquetário) são os mais comuns RTKs (receptores tirosina quinase). Atividade intrínseca de tirosina quinase e formas aberrantes destes receptores são encontradas nos glioblastomas, a ativação constitutiva de EGFR foi detectada em 45% das amostras de GBM (MCLENDON et al., 2008).

A PI3K é translocada para a membrana plasmática após a ativação do RTK. A PI3K ativada produz  $PIP_3$  a partir de  $PIP_2$ , (FIGURA 1). O acúmulo de  $PIP_3$  recruta a *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) e também a AKT. A ativação de AKT promove a sobrevivência celular por facilitar a translocação do fator nuclear  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) que em seguida ativa a transcrição de genes relacionados com a proliferação e sobrevivência (KARIN et al., 2002). Um estudo imunohistoquímico com 70 pacientes com GBM e micro-arranjo de tecido constatou que 91,3% das amostras tinham alta expressão de NF $\kappa B$  e consequente altos níveis de AKT (WANG et al., 2004).

Na via PI3K-AKT, há um mecanismo para terminar a sinalização. Uma fosfatase  $PIP_3$  específica (PTEN nos humanos) remove o fosfato na posição 3 do  $PIP_3$  para produzir  $PIP_2$ , que não serve como um sítio de ligação para AKT, e a cadeia sinalizadora é quebrada (FIGURA 1) (NELSON; COX, 2005). Mutações no gene *PTEN* em GBMs resultam em elevados níveis de  $PIP_3$  levando a hiperfosforilação de PDK1/AKT. Em GBM foram encontrados 36% de mutações no gene *PTEN* (MCLENDON et al., 2008).

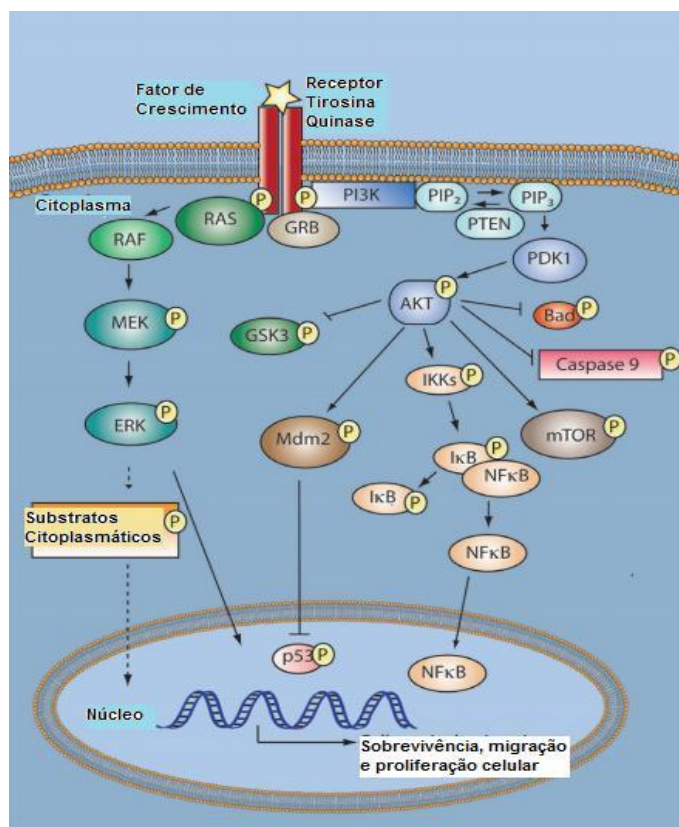


FIGURA 1 – SINALIZAÇÃO PRÓ-SOBREVIVÊNCIA EM GLIOBLASTOMAS.

FONTE: KRAKSTAD; CHEKENYA (2010)

NOTA: O receptor Tirosina quinase é ativado constitutivamente em GBM, por ex: EGFR, PDGFR, enviando sinais para ativação da via ERK-Ras-MEK para mediar crescimento celular e angiogênese, e para a via da PI3K/AKT para mediar sobrevivência. AKT fosforila vários substratos que levam a liberação de fatores de sobrevivência ou de interferência com a execução da apoptose.

A subunidade p110 $\alpha$  de PI3K é codificada pelo gene *PIK3CA*, e uma substituição somática de nucleotídeos neste gene foi detectada em 6 de 91 amostras seqüenciadas de GBM (MCLENDON et al., 2008). A subunidade regulatória p85 $\alpha$  de PI3K é codificada pelo gene *PIK3R1*. Mutações constitutivas nesse gene foram detectadas em 9 de 91 amostras de GBM (MCLENDON et al., 2008). Ambos os genes citados provocam ativação constitutiva de PI3K, porém foram relatadas mutações exclusivas em *PIK3CA* ou *PIK3R1* em 8 a 10% de casos de GBM (PARSONS et al., 2008). A mutação somática do gene *AKT* foi identificada em neoplasias de mama e ovário, porém não foi encontrada esse tipo de alteração em um painel de 109 amostras de GBM e 9 linhagens de astrocitomas (BLEEKER et al. 2009), indicando que a ativação de AKT em GBM não é mediada por essa mutação, e sim por mutação no gene *PTEN* que leva um aumento da atividade de AKT.

Pacientes com GBM que possuem PI3K (n=42/56) e AKT (37/56) ativados



tiveram uma sobrevida média de 11 meses em comparação com 40 meses apresentados por pacientes com menores níveis de ativação dessas proteínas (CHAKRAVARTI et al. 2004). Este dado corrobora os achados que evidenciam a importância da via PI3K e AKT em GBM, demonstrando que a atividade elevada desta cascata de sinalização induz sobrevivência e proliferação celular.

#### 2.2.2.3 Sinalização entre o Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e Ras

Uma das vias de transdução de sinal que medeia crescimento, sobrevivência, invasão celular e angiogênese que está envolvida com o desenvolvimento de vários tumores é a cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK).

Uma das proteínas que iniciam essa via é a proteína G Ras. Após a sensibilização do receptor Tirosina quinase (EGFR ou PDGFR) pelo seu ligante (fator de crescimento) ou por ativação constitutiva, ocorre uma autofosforilação dos resíduos de tirosina e seguinte ativação da proteína Ras (NELSON; COX, 2005).

A ativação de Ras recruta Raf para a membrana celular e subsequente promove fosforilação de PKC (proteína quinase C) que culmina na ativação da via das proteínas MAPK/ERK (quinase ativada por sinal extracelular) 1 e 2, ver figura 1 (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010). Após ativação de ERKs, outros substratos citoplasmáticos são fosforilados e são translocados para o núcleo onde atuam como fatores de transcrição, incluindo o I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B e a proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CREB), que respectivamente, regulam a sobrevivência e proliferação das células de glioma (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010). Portanto, as vias PI3K/AKT e Ras/MAPK, são importantes para a sobrevivência e crescimento celular e estão constitutivamente ativadas em diferentes tumores, incluindo os gliomas.

#### 2.2.2.4 Sinalização de p53

A proteína p53 é codificada pelo gene *TP53* (*p53* em murinos), localizado no cromossomo 17p13 humano. Ela é uma fosfoproteína, possui 393 aminoácidos, e possui um papel central para a resposta celular (SHAMSARA, 2009).

Inicialmente, quando foi descoberto, o gene *p53* foi considerado um oncogene, pois quando o cDNA codificante para p53 foi transfectado em fibroblastos de embrião de rato, ele parecia contribuir para sinais indutores de crescimento que acabaram resultando na transformação celular na presença de um oncogene concomitantemente expresso, por exemplo *ras*, porém, mais tarde foi evidenciado que esse cDNA, foi originalmente sintetizado utilizando um mRNA extraído a partir de células tumorais. A subsequente manipulação de um cDNA de *p53* clonado a partir de um mRNA de células normais, em vez de favorecer a transformação celular, na verdade suprimiu esse processo (WEINBERG, 2008).

Esses resultados indicaram que o alelo tipo selvagem de *p53* codifica a proteína p53 que atua na supressão da proliferação celular, e que p53 adquire funções para o estímulo do crescimento celular somente quando o gene *p53* apresenta uma mutação pontual. Por meio dessa descoberta, o gene *p53* foi finalmente classificado como um gene supressor de tumor (WEINBERG, 2008).

A sobrevivência ou morte celular é determinada pela combinação dos sinais iniciados por p53, que por sua vez, regula as proteínas alvo que estão envolvidas na parada do ciclo celular, reparo de DNA. Se os danos forem irreparáveis, ocorre a sinalização para apoptose (CHEN; WANG; EL-DEIRY, 2010).

Estudos da função de p53 têm revelado que uma variedade de situações de estresse celular e fisiológico pode causar um rápido aumento nos níveis dessa proteína. Como situações ativadoras, podemos citar: a falta de nucleotídeos no DNA, radiação UV, radiação ionizante, sinalização de oncogene, hipoxia e bloqueio de transcrição gênica (WEINBERG, 2008). A proteína acumulada (após receber algumas modificações pós-traducionais) passa a induzir respostas já citadas no parágrafo anterior.

Uma forma de controle de p53 é a regulação pela proteína Mdm2. A ligação de Mdm2 a p53 bloqueia imediatamente a capacidade da proteína em realizar sua função, e direciona a degradação de p53 mediada por proteassomos. Sinal de sobrevivência via PKB/AKT ativam Mdm2 que aumenta a degradação de p53 (FIGURA 1). Em algumas situações – especificamente, quando as células estão sofrendo determinados tipos de estresse ou dano, moléculas de proteína p53 devem

ser protegidas de seu executor Mdm2, de maneira que possam ser acumuladas em níveis funcionalmente significativos na célula. A proteção é então alcançada por meio de fosforilação de p53, a qual bloqueia a capacidade de Mdm2 de se ligar à p53 e desencadear sua ubiquitinação (MICHAEL; OREN, 2003).

A fosforilação de p53 ocorre em resíduos de aminoácidos na região N-terminal por quinases como ATM, Chk1, e Chk2 – as quais se tornam ativadas em resposta ao dano ao DNA (BOUCHET et al. 2006).

Em glioblastomas a via de p53 está alterada em 87% dos casos, com mutação pontual em *TP53* em 35-40% destes (MCLENDON et al., 2008; Parsons et al. 2008).

#### 2.2.2.5 Sinalização de pRB (proteína do retinoblastoma)

O destino das unidades celulares é ditado por sinais que cada uma delas recebe de seus arredores. Assim, quase todos os tipos de células normais não proliferarão a menos que sejam induzidas por fatores de crescimento mitogênicos. A progressão pelo ciclo celular é controlada por proteínas ciclinas e por CDKs (quinases dependentes de ciclinas), que tem como função fosforilar proteínas chaves, dentre elas a pRB. Na carcinogênese o que ocorre é um descontrole do ciclo celular (ALONSO, 2008; WEINBERG, 2008).

A proteína pRB é uma fosfoproteína nuclear de cerca de 105 kDa, ela é codificada pelo gene *RB1* localizado no cromossomo 13q14. Inicialmente, por citogenética, foi detectado em pacientes com retinoblastoma uma perda da heterozigosidade do gene *RB1*, levando os pesquisadores a postular que sua perda poderia levar ao desenvolvimento deste tipo de câncer. Desta forma *RB1* foi classificado como um gene supressor tumoral (WEINBERG, 2008; WIMAN, 1993).

A decisão da célula entre crescer ou quiescer é governada pelo estado de fosforilação de pRB. As ciclinas D e a ciclina E controlam o grau de fosforilação da proteína do retinoblastoma. A hipofosforilação de pRB bloqueia a passagem pelo ponto de restrição (esse ponto representa um momento no qual a célula compromete-se, de modo irreversível, a completar o ciclo celular ou, alternativamente, permanecer na fase G1 e possivelmente recuar do ciclo celular

ativo para G0) enquanto que pRB hiperfosforilada permite tal passagem. Isto acontece por meio da ligação ou liberação dos fatores de transcrição E2F associados a promotores de genes que conduzem a célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Quando pRB está hipofosforilada liga-se a E2F, enquanto que pRB hiperfosforilada as libera (WEINBERG, 2008; HULLEMAN, 2005).

Em glioblastomas a via de pRB está alterada em 78% dos casos, com deleção homozigótica de *RB* em 11% (MCLENDON et al. 2008), já no trabalho de Parsons et al. (2008), que levou em consideração várias amostras de GBMs, a taxa de mutação para *RB* foi de 68%.

### 2.2.3 Sintomas, Diagnóstico e Tratamento

Os sintomas podem variar dependendo o tipo de tumor, porém em um estudo do grupo “*Glioma Outcomes Project*”, publicado no *The Journal of the American Medical Association* (JAMA) em 2005, foi demonstrado que a principal queixa dos pacientes foi a forte dor de cabeça, seguido por perda de memória, e também pelos outros sintomas abaixo:

- Convulsões;
- Náuseas e vômitos;
- Déficit de linguagem;
- Mudança de personalidade;
- Déficit motor;
- Tontura;
- Déficit cognitivo e sensorial;
- Problemas visuais.

O diagnóstico dos gliomas se baseia na clínica do paciente (sintomas comuns de doenças neurológicas) seguido de exames de imagens como, por exemplo, tomografia computadorizada e ressonância magnética; e finalmente análise de biópsia do tumor por um neuro-patologista.

O tratamento dos tumores do SNC não é generalizado, dependendo muito do tipo de tumor em questão. No Brasil, os esquemas de tratamento seguem as

recomendações da ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) que preconizam desde redução cirúrgica (em determinados casos) até uso da temozolomida em combinação à radioterapia (KATZ et al., 2009).

A adição da temozolomida em combinação com a radioterapia pode aumentar em até 5 anos a sobrevida dos pacientes quando comparados com a radioterapia isolada em pacientes diagnosticados precocemente com glioblastoma (STUPP et al., 2009; STUPP et al., 2005 ).

A temozolomida é um agente alquilante diverso, da classe dos triazenos, é o fármaco de escolha para tratar gliomas malignos. Seu mecanismo de ação consiste em liberar o metabólito alquilante MTIC (metiltriazenoimidazolcarboxamida) que causa dano citotóxico nas células em todas as fases do ciclo celular. Sua toxicidade é bem alta, promovendo náuseas e vômitos em mais de 90% dos pacientes; em geral, os vômitos ocorrem de 1 a 3 horas após o tratamento e podem perdurar por até 12 horas. Outros efeitos adversos que podem ocorrer são: mielossupressão, uma síndrome com sintomas semelhante à gripe, hepatotoxicidade, alopecia, rubor facial, neurotoxicidade e reações dermatológicas (BRUTON et al., 2006; NAJMAN; GADELHA, 2002).

Além da toxicidade da temozolomida, um mecanismo de resistência à droga foi encontrado em cerca de metade dos pacientes com glioblastoma. Trata-se de um silenciamento epigenético (desmetilação) no promotor da enzima de reparo O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-transferase (MGMT). A temozolomida faz a alquilação das bases de DNA (levando a célula tumoral à morte). Nestes pacientes, devido à desmetilação do promotor do gene *MGMT*, a enzima MGMT consegue restaurar as bases alquiladas, devolvendo a integridade ao DNA, promovendo uma resistência destas células à morte (WELLER et al., 2010; FULDA et al., 2002).

A alta toxicidade dos tratamentos utilizados atualmente na clínica, mecanismos de resistência das células tumorais aos agentes antineoplásicos e o potencial invasivo dos gliomas justificam a busca por novas terapias menos agressivas.

Consideração que a célula tumoral não está isolada em seu micro-ambiente circundante, o conhecimento dos mecanismos de interações da célula com os componentes da matriz extracelular é de extrema importância para a diminuição do potencial invasivo dos gliomas.

## 2.3 MATRIZ EXTRACELULAR E METALOPROTEASES

### 2.3.1 MEC: estrutura e função

Os tecidos não são constituídos somente por células. Uma grande parte de seu volume é o espaço extracelular, o qual é, em grande parte, preenchido por uma rede complexa de macromoléculas que constituem a matriz extracelular (ALBERTS et al. 2004). A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido e forma um substrato tridimensional que ajuda a organizar células em tecidos e coordena suas funções celulares, ativando vias de sinalização intracelular para o controle do crescimento, proliferação e expressão gênica (LODISH et al., 2005).

A matriz extracelular (MEC) é formada por três principais classes de moléculas biológicas. A primeira delas são os colágenos – fibras que proporcionam resistência mecânica; proteoglicanos e glicosaminoglicanos – que atuam em vários processos celulares, por exemplo: o percalam, que forma um filtro seletivo para regular o tráfego de moléculas e células de acordo com o tamanho e carga; e por fim proteínas solúveis de matriz – altamente especializadas, como por exemplo, a laminina que faz parte da composição da lâmina basal (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; LODISH et al. 2005).

Cada tecido produz sua matriz extracelular, e pode variar sua composição de acordo com sua função. No sistema nervoso central (SNC) os maiores componentes da MEC, como, laminina, fibronectina e colágeno são pouco detectáveis próximo a neurônios e células da glia. A MEC do SNC é dominada por uma diversidade de moléculas como proteoglicanos de condroitim sulfato, ácido hialurônico e de glicoproteínas multiméricas do tipo tenascina (SANES, 1989).

A MEC do SNC também atua como um reservatório de fatores que promovem a proliferação, diferenciação e migração celular. Entre esses fatores, alguns dos mais versáteis são as enzimas metaloproteases de matriz (MMPs) e os ativadores de plasminogênio, relacionadas com o processo de neuritogênese e em processos fisiológicos clássicos, como por exemplo, o cone de migração do crescimento axonal, mas também estão relacionadas com os processos de invasão tumoral (LUKES et al., 1999; STERNLICHT; WERB, 2001).

### 2.3.2 Metaloproteases de matriz e seus inibidores teciduais

As metaloproteases de matriz (MMPs) são uma família multigênica de endopeptidases dependentes de zinco, há mais de vinte membros dessa família divididos em cinco subgrupos de acordo com seu substrato: a) Colagenases – ativas contra colágenos fibrilares, b) Gelatinases – altamente ativas contra colágenos desnaturados, c) Estromalisinas – degradam componentes não colágenos, d) Matrilisinas – caracterizadas pela ausência do domínio hemopexina e e) Metaloproteases de membrana (MT-MMPs) – que são MMPs transmembranas (MENG et al. 2008; NAGASE et al. 2006; RAFFETTO e KHALIL, 2008). A estrutura e domínios das enzimas MMPs estão representados na figura 2.

As MMPs podem degradar a maioria dos componentes da MEC e também proteínas conectoras teciduais (VU, WERB, 2000). MMPs são importantes na criação dos microambientes necessários para a embriogênese e desenvolvimento, modulando a atividade de biomoléculas ativas e de seus inibidores (VISSE, NAGASE, 2003; NAGASE et al., 2006). As MMPs desempenham papéis em processos fisiológicos, tais como o remodelamento tissular, cicatrização, angiogênese; e em doenças como o ateroma, artrite e ulceração tecidual. Níveis aumentados destas enzimas podem ser detectados em vários tipos de câncer (VISSE, NAGASE, 2003). Também em situações patológicas as MMPs, além de degradar componentes da MEC, causam um aumento na permeabilidade capilar e também atuam em processos de desmielinização; essas enzimas estão envolvidas em doenças como: tumores cerebrais (já citado), esclerose múltipla, síndrome de Guillain-Barré, isquemia cerebral, Alzheimer e infecções (AGRAWAL; LAU; YONG, 2008; LUKES et al., 1999).

No SNC, as MMPs são produzidas na forma de pré-proenzimas (zimogênios) e secretadas pelos astrócitos, células da microglia e pelas células endoteliais vasculares como pró-MMPs. A ativação das pró-MMPs se dá através de processamento proteolítico realizado por outros membros da família das MMPs, que removem o pró-peptídeo amino-terminal e causam a ruptura da interação Cys-Zn<sup>2+</sup>, o que permite que uma molécula de água se ligue ao Zn<sup>2+</sup>, ocasionando a hidrólise (LUKES et al., 1999; NAGASE, WOESSNER, 1999).

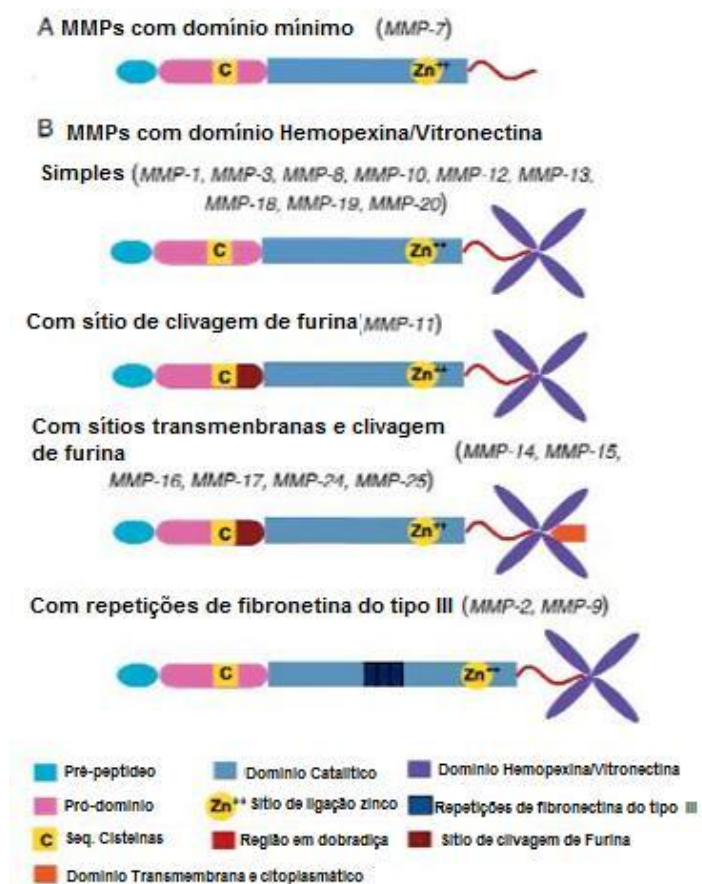


FIGURA 2 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE MMPS.

FONTE: VU, WERB (2000).

NOTA: Diagrama dos domínios de diferentes subgrupos da família de MMPs. O pró-domínio contém uma sequência altamente conservada de cisteína, este grupo sulfidríla interage com o  $Zn^{2+}$  mantendo assim o sítio ativo da enzima em forma latente. O pró-domínio de algumas MMPs possui um domínio de ligação Furina, quando ocorre sua clivagem resulta em ativação da MMP. O domínio catalítico das gelatinases (MMP 2 e MMP 9) contém três repetições de fibronetina do tipo II responsáveis pela ligação à gelatina. O domínio hemopexina/vitronectina é dobrado em uma estrutura de quatro pás. Em (A) MMPs com domínio mínimo, e em (B) as MMPs com domínio hemopexina/vitronectina.

A atividade das MMPs é regulada por três classes de moléculas: (1)  $\alpha_2$  – macroglobulina, glicoproteína presente no plasma, (2) pelos seus respectivos inibidores teciduais, conhecidos como TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), e (3) pela proteína RECK, uma glicoproteína ancorada à membrana. As TIMPs atuam inibindo as MMPs através da interação física, formando complexos TIMP-MMP, porém é interessante citar que TIMP 2 possui um papel dual, além de inibir as enzimas MMPs pode atuar também na ativação de MMP 2 (BODE et al., 1999; NAGASE et al., 2006). Para exemplificar, o complexo TIMP 2 ligado à MT1-MMP (uma metaloprotease de membrana, também conhecida como MMP 14) faz a desestabilização da pré-pró-MMP 2, enquanto que outra molécula de MT1-



MMP cliva o peptídeo, formando a pró-MMP 2, que sofre então uma autólise liberando a MMP 2 ativa (STRONGIN et al., 1995).

### 2.3.3 MMPs e Gliomas

Uma característica das células de glioma é sua capacidade de invadir extensivamente em torno do parênquima cerebral, particularmente ao redor da substância branca, o que torna as terapias focais incapazes de controlar o crescimento tumoral e resultando na recorrência da doença (CORREA et al., 2010; PARK; KWAK; LEE, 2008). Uma das barreiras de controle da invasão é a MEC. Para superar a barreira da MEC, essas células expressam proteases que auxiliam na migração celular e invasão. As MMPs possuem um papel importante nessa degradação, pois, podem degradar quase todos os tipos de macromoléculas de matriz no cérebro (LEVICAR; NUTALL; LAH, 2003). Muitos autores têm demonstrado uma alta expressão de MMPs em gliomas, principalmente das gelatinases MMP 2 e MMP 9 e também da MT-MMP (NAKADA; OKADA; YAMASHITA, 2003).

Além de degradarem a MEC para o processo de invasão, as MMPs em conjunto com outras proteases, por exemplo: serinoproteases e cisteínoproteases, atuam na degradação da matriz para o processo de angiogênese, bem característico de tumores cerebrais (LAKKA; GONDI; RAO, 2005).

A MT-MMP como já citado é uma MMP que está ancorada à membrana, desta forma ela não é secretada como as outras MMPs. Esta localização de membrana leva a áreas focais de recrutamento de receptores e atividade, reforçando assim a proteólise pericelular em áreas específicas do cérebro (FILLMORE; VANMETER; BROADDUS, 2001). Desta classe a MT1-MMP é a mais bem caracterizada, recentemente foram relatadas que as células transformadas possuem estruturas salientes de membrana ricas em MT1-MMP, conhecidos como “invadopódios”, que aumentam ainda mais a degradação de MEC, abrindo caminho para as demais células tumorais invadir outros sítios anatômicos (POINCLOUX; LIZÁRRAGA; CHAVRIER, 2009).

O equilíbrio entre MMPs e TIMPs é fundamental para a disseminação das células de glioma (PLANCHENAUT et al., 2001). Estudos realizados por Nakada et. al (2001) indicaram um nível mais elevado de produção de TIMP 1, mas não de TIMP 2, em glioblastomas. Na verdade esse é um achado comum em diversos cânceres humanos, incluindo o de estômago, tireóide, endométrio e carcinomas orais. Pesquisadores têm demonstrado a atividade de MMP 2, inclusive na presença abundante de TIMP 1 (SHIMADA et al., 2000; NAKAMURA et al., 1999), sugerindo que a superexpressão de TIMP 1 não atua como inibidor desta metaloprotease nos tecidos neoplásicos. Por outro lado, são encontrados resultados conflitantes sobre a expressão de TIMP 2 em gliomas. Alguns autores demonstraram um baixo nível em glioblastomas, mas outros não demonstraram nenhuma correlação entre a expressão de TIMP 2 e o grau do tumor (NAKADA et al. 2001). No entanto, dados obtidos por Hoshi et al. (2000), usando células U87MG que superexpressam TIMP 2, ocorreu diminuição da invasão celular. Nakada et al. (2001) mostrou que um nível baixo de produção de TIMP 2 correlaciona com pequena sobrevida em pacientes com glioblastoma.

## 2.4 RECK: UM INIBIDOR DE MMPs

### 2.4.1 Estrutura de RECK

RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) é uma glicoproteína descoberta por Takahashi et al. (1998) através do *screening* de uma biblioteca de cDNA de fibroblastos humanos normais para genes que, quando transfectados em células NIH3T3 transformadas por *v-Ki-ras* poderiam induzir a reversão do fenótipo maligno. O gene *RECK* está localizado no braço curto do cromossomo 9, possui 87 kb e consiste de 21 exóns e 20 introns, e identificado 13 SNPs – single nucleotide polymorphisms – (EISENBERG et al., 2002).

A glicoproteína RECK possui 971 resíduos de aminoácidos, e peso molecular de aproximadamente 110 kDa, um esquema representativo dos domínios protéicos de RECK está indicado na figura 3. Essa proteína é rica em resíduos de cisteína

(9%) e contem tanto na suas extremidades NH<sub>2</sub> e COOH-terminal regiões hidrofóbicas. Sequenciamento do peptídeo maduro da proteína expressa em células de mamíferos indicou que região hidrofóbica da extremidade N-terminal serve como um peptídeo sinal e que a outra região hidrofóbica da ponta C-terminal atua como um sinal para ancoragem de glicosilfosfatidilinositol (GPI), a parcela média da proteína contem três domínios com atividade inibidora de serina proteases, sendo um (o primeiro) consenso com o motivo “Kazal”. RECK também possui duas regiões com fraca homologia com o fator de crescimento epidermal (EGF) (NODA et al., 2003; TAKAHASHI et al., 1998).

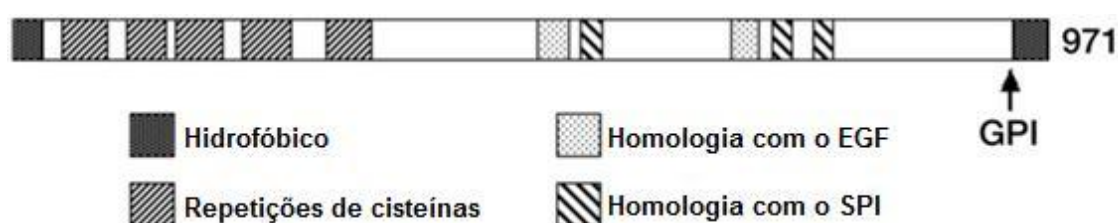


FIGURA 3 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA RECK.

FONTE: TAKAHASHI et al.(1998).

NOTA: regiões de homologia com o fator de crescimento epidermal (EGF), SPI: domínio com atividade inibidora de serina proteases, GPI: glicosilfosfatidilinositol.

No recente trabalho de Omura et al. (2009), a proteína RECK recombinante foi purificada e com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e reconstrução por imagens computadorizadas foi determinado que a proteína (presente da forma de um dímero) tem uma estrutura tridimensional semelhante a um sino. O domínio C-terminal estaria localizado na porção superior do sino, e a molécula seria ancorada a membrana e a abertura ficaria exposta, podendo assim interagir com várias moléculas próximas à superfície celular.

#### 2.4.2 Funções de RECK

A principal função da proteína RECK sugere que ela inibe a atividade de MMPs através de vários mecanismos, incluindo inibição direta da atividade protease, a regulação de sua liberação da célula, e possivelmente, através do sequestro de MMPs na superfície celular (WELM; MOTT; WERB, 2002).

O gene *RECK* é expresso em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão é reprimida ou diminuída durante a transformação celular, uma vez que a expressão desse gene não foi detectada em inúmeras linhagens tumorais analisadas (TAKAHASHI et al., 1998).

Na transformação celular mediada por diferentes oncogenes como *ras*, *fos*, entre outros, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em secreção aumentada de MMPs, as quais contribuem para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células tumorais. O mecanismo proposto atualmente para RECK é que esta glicoproteína inibe pelo menos três membros da família das MMPs, incluindo MMP 2, MMP 9 e MT1-MMP (TAKAHASHI et al., 1998; OH et al., 2001; SASAHARA et al., 2002), (FIGURA 4).

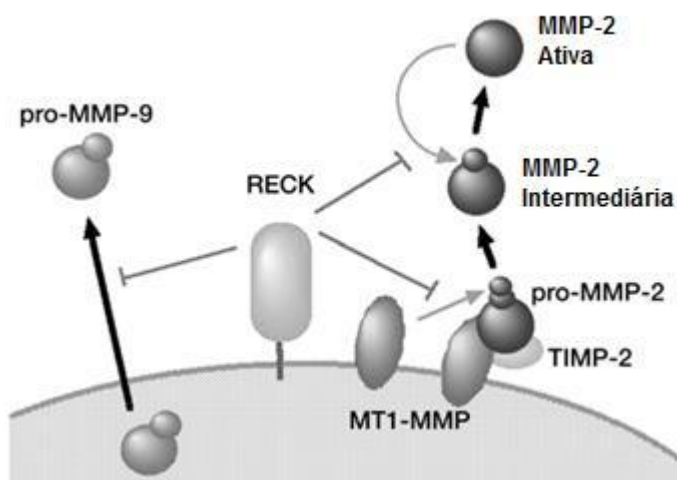


FIGURA 4 – MODELO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPS POR RECK.

FONTE: NODA et al.(2003).

NOTA: A proteína RECK é associada à membrana plasmática através de uma âncora GPI. RECK é capaz de inibir a transcrição, secreção e atividade da pró-MMP-9 e a atividade enzimática das enzimas MT1-MMP e MMP-2.

Através de ensaios bioquímicos, foi mostrado que a proteína RECK purificada se liga a MMP 9 e inibe a sua atividade proteolítica, por meio de um mecanismo ainda não explorado, sendo possível a formulação do seguinte modelo: em células normais, a secreção de MMP 9 está bloqueada pela ligação da mesma à proteína RECK, o qual está ancorada na membrana plasmática. Durante o processo de transformação celular, a expressão de RECK é inibida, resultando em liberação de MMP-9 (TAKAHASHI et al., 1998). O processamento da MMP 2, entretanto, ocorre por duas clivagens proteolíticas consecutivas, que ocorrem preferencialmente na membrana plasmática. RECK regula a ativação da próMMP 2 pela inibição de duas enzimas proteolíticas necessárias para este processo, a MT1-MMP e a MMP 2 ativa

(OH et al., 2001). Estes resultados indicam que a função da proteína RECK é suprimir a secreção de MMP 9, inibir o processamento proteolítico da MMP 2, e inibir diretamente a atividade de MT1-MMP. Desta forma, a inibição de RECK contribui para a transformação das células, através da produção descontrolada destas MMPs (NODA e TAKAHASHI, 2007). Também foi relatado que quando restaurada a expressão de RECK em células malignas, ocorre uma supressão da capacidade invasiva associada ao decréscimo da secreção e transcrição de MMP 9 (TAKAHASHI et al., 1998).

Como mencionado anteriormente, as MMPs degradam componentes da MEC nos estados normais e patológicos. RECK mantém estes processos sob controle e, em sua ausência as MMPs degradam a MEC de maneira descontrolada (OH et al., 2001). RECK é requerido para o desenvolvimento embrionário normal, facilitando o remodelamento tissular ordenado, mantendo íntegra a MEC ao redor dos vasos sanguíneos em formação e do tubo neural (CLARK et al., 2007; OH et al., 2001). Embriões *knockout* para *RECK* mostraram ruptura dos tecidos mesenquimais e da organogênese, desenvolvendo hemorragias abdominais, e morrendo por volta do décimo dia da fase embrionária (OH et al., 2001).

A superexpressão de *RECK* em células HT1080 limitou a ramificação vascular, suprimindo a angiogênese tumoral (OH et al., 2001). A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, e requer a degradação de membrana basal vascular e remodelamento da MEC, a fim de permitir que as células endoteliais possam migrar para o tecido adjacente, que é uma característica indispensável para o desenvolvimento de um tumor e sua progressão maligna. Desta forma, uma alta expressão de *RECK* ocasiona uma diminuição da atividade de MMPs, assim a glicoproteína RECK pode ser considerado como um regulador da angiogênese (MENG et al., 2008).

Ainda relatando as funções de RECK, foi observado por Simizu et al. (2005), que a seqüência de aminoácidos da proteína possui cinco supostos sítios de N-glicosilação. Nesse estudo, foi examinada a relação entre a glicosilação e a função de RECK em linhagens de células tumorais, indicando que a glicosilação não é essencial para a localização celular da proteína, porém, é um fator importante para a supressão da invasão das células, e o estado de glicosilação de RECK pode ter um papel importante na inibição de MMPs. Os resultados mostraram que quando esses sítios estavam glicosilados RECK suprimiu a invasão celular.

Em células de glioma, Correa et al. (2006), compararam duas linhagens celulares quanto a expressão de *RECK*, são elas: T98G (com um caráter altamente invasivo) e A172 (não invasivo), a primeira apresentou um menor nível de expressão de mRNA de *RECK* quando comparado com a segunda, levando os autores a sugerir que a expressão do gene é diminuída pelo caráter invasivo da linhagem T98G. A expressão de *RECK* também foi avaliada durante a progressão maligna de gliomas por Winnishofer (2005), para isso foram utilizadas amostras teciduais de pacientes com astrocitomas de diferentes graus de malignidade e não-tumorais. Neste trabalho foi verificado que a expressão de *RECK* não é alterada com a progressão do glioma, porém, pacientes que manifestaram um maior tempo de sobrevida apresentaram tumores com uma significativa maior expressão do gene *RECK*.

Recentemente Correa et al. (2010), demonstraram que a superexpressão de *RECK* diminuiu a invasão e migração de células T98G. Quando comparada com a linhagem parental, a linhagem T98G/*RECK*+ apresentou drásticas modificações no seu citoesqueleto, através de rearranjos dos filamentos de actina, promovendo uma diminuição na capacidade migratória. Também foi observado neste estudo, que a proteína *RECK* está localizada predominantemente nas lamelas celulares, ou seja, na vanguarda de migração.

Embora *RECK* seja um gene recentemente descrito (TAKAHASHI et al., 1998), a literatura relata a possibilidade de utilização deste gene como marcador molecular para prognóstico de diferentes tipos de tumores (WINNISCHOFER, 2005; TAKENAKA et al. 2004; NODA, TAKAHASHI, 2003; MASUI et al. 2003; FURUMOTO et al. 2001), portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na inibição, modulação e ativação da expressão do gene *RECK* poderá permitir o desenvolvimento de estratégias para restaurar ou aumentar sua expressão em células tumorais, suprimindo assim, o comportamento maligno dessas células.

### 2.4.3 Regulação de *RECK*

#### 2.4.3.1 *RECK* e *Ras*

Em vários tumores é frequente a mutação do proto-oncogene *ras*. A proteína Ras é essencial para a sinalização intracelular e como está envolvida na cascata Ras/Raf/MEK/ERK atua no comportamento celular e também na regulação da expressão gênica. Como já citado em 1998, Takahashi et al. relataram que o gene *RECK* é negativamente regulado por *ras* ativado.

Para elucidar o mecanismo pelo qual *ras* regula a expressão de *RECK*, Sasahara et al. (1999) caracterizaram a porção da região promotora do gene *RECK* de camundongos que é responsiva à sinalização mediada pela oncoproteína Ras. Tal elemento responsivo encontra-se entre os nucleotídeos -53 e +82 do promotor de *RECK*. Nesta porção do promotor existem duas regiões com sequência consenso para a ligação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3, sendo que uma destas duas regiões está localizada a montante do sítio de início da transcrição (denominado Sp1(A)), enquanto que outra encontra-se a jusante (Sp1(B)). Foi verificado que os fatores de transcrição Sp1 e Sp3 podem ligar-se a ambos os sítios, mas apenas o sítio Sp1(B) parece ser importante para a regulação de *RECK* mediada por Ras (SASAHARA et al. 1999a, 1999b e 2002).

A sinalização mediada por Ras neste sistema pode atuar de acordo com 3 modelos propostos: (a) por modulação pós-traducional dos fatores de transcrição Sp1/Sp3, fosforilando ou glicosilando os mesmos, modulando assim sua capacidade de ligação às regiões responsivas no promotor de seus genes alvos; (b) por modulação de proteínas regulatórias da via de transdução de sinal que controlam a transcrição de Sp1/Sp3; e (c) por modulação de interações entre Sp1/Sp3 e outras proteínas regulatórias (SASAHARA et al. 2002).

A repressão da transcrição de *RECK* via *ras* pode ser relacionada com o mecanismo de desacetilação de histonas. A indução oncogênica de *ras* faz um aumento da interação da proteína Sp1 com a desacetilase de histona 1 (HDAC1) e induz a ligação da HDAC1 ao local de ligação de Sp1 na região promotora de *RECK*. Desta forma, Ras/Raf/MEK/ERK fosforilam as desacetilases de histonas que se ligam no sítio Sp1 inibindo a transcrição de *RECK* (CHANG et al, 2004).

Outro mecanismo de regulação que envolve *ras* é a indução de metiltransferases de DNA (DNMT). A proteína Ras controla a metilação de DNA por ativação das DNMTs. Essas enzimas são responsáveis por transferir grupamentos metilas para as citosinas localizadas nas ilhas CpG de promotores gênicos.

Portanto, Ras regula negativamente a transcrição do gene *RECK* por promover uma hipermetilação da sua região promotora pelas DNMTs – mais especificamente a DNMT3b (CHANG et al. 2006; SASAHARA et al. 2002).

#### 2.4.3.1 Outras formas de regulação de *RECK*

Recentemente foi detectado em neoplasias humanas a presença elevada de microRNAs (miRNAs), essas moléculas são pequenos transcritos não codificantes de 18 a 25 nucleotídeos que modulam a expressão protéica por se ligarem complementarmente a sequencias de mRNAs levando à degradação ou inibição traducional. Especialmente nos gliomas humanos o microRNA-21(miR-21) foi caracterizado como um fator anti-apoptótico e encontra-se altamente transcrito nestas células (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005). Outro achado bem importante sugere que miR-21 atua na regulação do remodelamento da MEC, foi visto que altos níveis de miR-21 provoca uma ativação das MMPs, atuando como inibidor direto (pós-transcricional) de *RECK* e *TIMP 3* (GABRIELY et al., 2008).

Outro achado de regulação de *RECK*, porém em nível pós-traducional, foi encontrado em células pancreáticas ativadas (PSCs), estas células tem como característica a produção elevada de colágeno do tipo I, e estão envolvidas em doenças pancreáticas (fibrose, pancreatite crônica e câncer). As PSCs ativadas possuem mecanismos de degradar proteoliticamente *RECK*, porém a sinalização de TGF- $\beta$ /Smad3 protege a proteína *RECK* da degradação (LEE et al., 2008). A degradação proteolítica de *RECK* pode ser mediada pelas MMP 2 e MMP 7 quando estas estão em excesso, porém o significado destas interações ainda não está totalmente elucidado (OMURA et al., 2009).

#### 2.4.4 Transcritos alternativos de *RECK*



Como citado anteriormente o gene *RECK* está localizado no cromossomo 9, composto por 21 éxons e 20 íntrons. A presença de múltiplos íntrons nos genes eucarióticos permite a expressão de diferentes (ou relacionadas) proteínas a partir de um único gene, e isso é possível pelo processamento alternativo do transcrito primário e varia de forma tecido-específica ou de acordo com a fase do desenvolvimento (LODISH et al., 2005).

Os transcritos alternativos de *RECK* estão sendo identificados e caracterizados por nós em colaboração com o grupo da Dra. Mari Cleide Sogayar, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Utilizando o programa BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*) foi possível identificar diferentes transcritos alternativos de *RECK*, sendo que neste trabalho os transcritos analisados estão representados na figura 5, juntamente com o transcrito canônico (denominado por nós como RECK A).

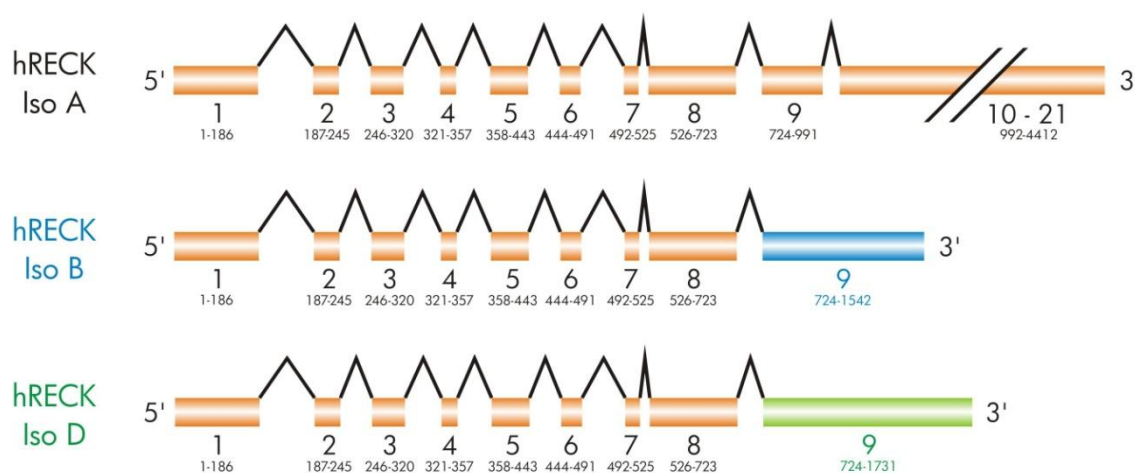


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK*. FONTE: LIMA et al. (2009).

NOTA: O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. Os transcritos alternativos estudados neste trabalho possuem 9 éxons, de forma que o nono éxon difere entre os três transcritos analisados.

A análise da estrutura do mRNA dos transcritos alternativos citados acima permite a predição de algumas propriedades estruturais das possíveis isoformas em comparação com a proteína RECK canônica, como por exemplo, a deleção dos motivos de Kazal, a perda ou não da sequência de ancoramento GPI, a perda da sequência inibidora de serino proteases. A figura 6 mostra a organização dos domínios preditos para os produtos protéicos codificados pelos transcritos alternativos de *RECK*. As predições sugerem que essas isoformas alternativas podem ter atividades e funções diferentes da proteína RECK canônica.

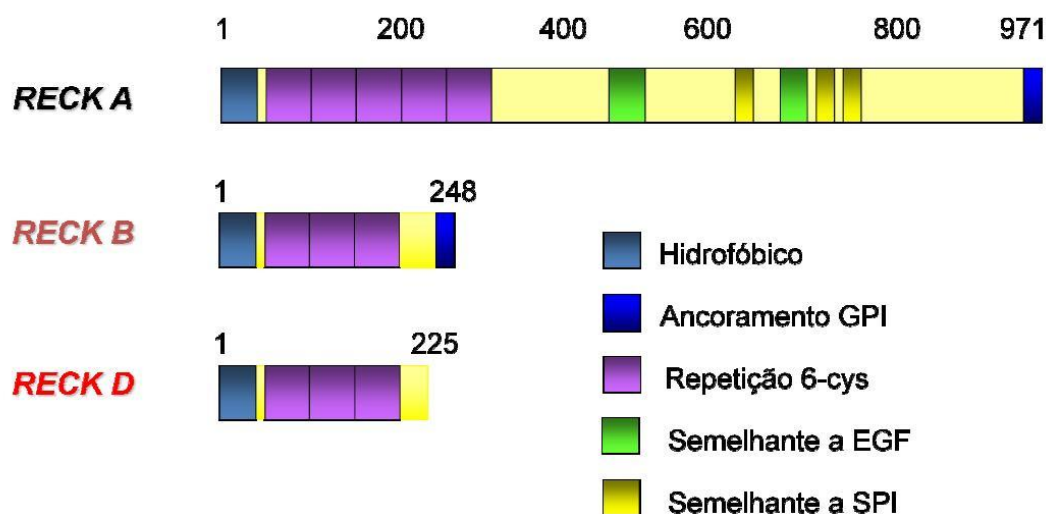


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTÉICOS CODIFICADOS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK*.

FONTE: LIMA et al. (2009).

NOTA: Os produtos protéicos possuem algumas características da proteína RECK A: o domínio hidrofóbico, as repetições de cisteínas e o ancoramento GPI (RECK B). Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos.

Um dos objetivos de estudo do nosso grupo é avaliar a modulação de RECK e inibidores de MMPs por biomoléculas e fármacos que possam contribuir com a terapia antitumoral, sendo a quercetina uma destas moléculas.

## 2.5 QUERCETINA

Os flavonóides podem atuar como reguladores de MMPs, entre eles, um dos mais estudados é a quercetina.

Nas plantas, os flavonóides estão presentes, em sua maioria, na forma gliconada, mas também são encontrados (em menor frequência) na sua forma genina, ou seja, agliconados (ERLUND, 2004; HARWOOD, 2007).

Os flavonóides estão presentes na maioria das frutas e vegetais comestíveis, mas o tipo de flavonóide obtido a partir de diferentes fontes alimentares varia. A quercetina é encontrada em alimentos como, por exemplo: cebolas, uvas, maçãs, amoras, cerejas, brócolis, frutas cítricas, chá (ERLUND, 2004; BISCHOFF, 2008). A tabela 1 mostra que a quercetina está presente nas plantas em diferentes formas

glicosídicas e também em diferentes quantidades de genina presente em cada alimento. Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos, Europa e Ásia estimaram que diariamente a ingestão de quercetina está na faixa de 4 a 68 mg (HERTOG et al. 1993, 1995; KNEKT et al. 1997; RIMMET al. 1996).

A quercetina possui inúmeros estudos e relatos de suas propriedades na saúde humana, como por exemplo: efeito antioxidante, anti-carcinogênico, anti-inflamatório, inibidor da agregação plaquetária e efeitos vasodilatadores (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DE QUERCETINA EM DIFERENTES FONTES

Flavonol	Fonte	Genina (mg/kg)
<b>Quercetina-3,4'-glucosídeo</b>	Cebola	284-486
<b>Quercetina-3-glucosídeo</b>		
<b>Quercetina-3-rhamnoglucosídeo</b>	Chá preto	10-25
<b>Quercetina-3-galactosídeo</b>	Maça	21-72
<b>Quercetina-3-rhamnosídeo</b>		
<b>Quercetina-3-glucosídeo</b>		
<b>Quercetina-3-rhamnoglucosídeo</b>	<i>Black currant</i>	44
<b>Quercetina-3-rhamnosídeo</b>		
<b>Quercetina-3-galactosídeo</b>		

FONTE: Adaptado de ERLUND (2004)

### 2.5.1 Propriedades químicas da quercetina

A quercetina [3, 3', 4', 5, 7- pentahidroxiflavona, CAS n. 117-39-5] é um flavonóide de ocorrência natural na dieta, faz parte da família dos flavonóis, eles são caracterizados como fenil-benzo(γ)pirona, consistindo de dois anéis benzenos (A e B) ligados a um anel pirano heterocíclico (FIGURA 7).

Os três anéis possuem uma conformação planar e a molécula é relativamente polarizada. Três ligações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio são observadas: duas entre o grupo carbonila e outra entre os grupamentos hidroxila no anel B (MENDOZA-WILSON; GLOSSMAN-MITNIK, 2004). Naturalmente, como já foi citada, a quercetina é encontrada na sua forma gliconada, com um ou mais açúcares

ligados no seu grupamento fenólico por ligações glicosídicas. A solubilidade em água é dependente da quantidade de unidades de carboidratos ligados a molécula, quanto maior o número de unidades monossacarídicas, maior a solubilidade.

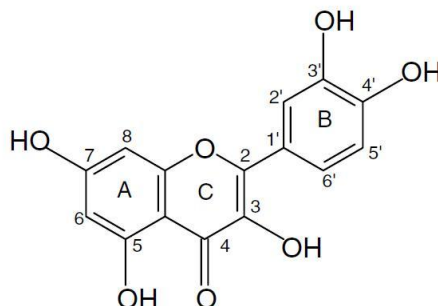


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.  
FONTE: HARWOOD et al.(2007)

A quercetina é estável no plasma humano, urina e água. Em condições básicas pode ocorrer instabilidade da quercetina devido à reatividade do anel central (C), resultando na fragmentação da estrutura do anel. A estrutura do anel central parece ser essencial para sua estabilidade (MOON et al., 2008).

A estrutura química da quercetina é essencial também para sua atividade, ela participa de reações formando complexos com metais, desta forma, afetando o transporte, reatividade, biodisponibilidade e toxicidade dos íons metálicos. No seu esqueleto químico há três possíveis sítios de quelação de metais que competem entre si, e podem ser classificados da seguinte forma: catecol >  $\alpha$ -hidroxicarbonila >  $\beta$ -hidroxicarbonila (CORNARD; DANGLETERRE; LAPOUGE, 2005).

A quercetina tem vários elementos estruturais característicos de funções antioxidantes: (1) as duas hidroxilas em posição orto no anel B - grupo catecol, (2) a presença da dupla ligação entre o C2 e C3 e (3) as hidroxilas substituídas em C3 e C4 em proximidade com a carbonila em C4 (SILVA et al., 2002). O potencial anti-proliferativo da quercetina pode ser atribuído as hidroxilas substituídas, particularmente no C3 do anel B e no C5 do anel A. Em contraste, outras substituições podem diminuir esse efeito, como por exemplo, a inserção de porções de carboidratos como ocorre naturalmente (LOA; CHOW; ZHANG, 2009).

## 2.5.2 Farmacocinética da quercetina

A farmacocinética da quercetina ainda não é bem caracterizada, embora uma série de estudos tenha sido realizado tanto em animais e humanos. Os flavonóides glicosilados quando ingeridos na dieta são resistentes a degradação pelo HCl (ácido clorídrico) no estomago, chegando intactos ao intestino delgado, lá as formas gliconadas são hidrolisadas pelas enterobactérias presentes no ceco e no cólon gerando as formas agliconadas que são absorvidas pelas células epiteliais por difusão simples (ERLUND, 2004; HOLLMAN et al. 1999).

A quercetina glucosídeo também pode ser diretamente absorvida via o transportador de glucose dependente de sódio do tipo 1 (SGLT-1) ou excretada para o lúmen pela proteína de resistência multidroga do tipo 2 (MRP-2) (WALGREN et al. 2000). Após sua absorção facilitada pelo transportador SGLT-1, os glucosídeos de quercetina são hidrolisados por  $\beta$ -glucosidases intracelulares/citosólica (CBG) (NÉMETH et al., 2003; WALGREN et al. 2000).

Outra enzima presente na membrana dos enterócitos, lactase *phlorizin* hidrolase (LPH), responsável pela hidrólise da lactose em glucose e galactose, possui uma atividade de hidrólise de formas gliconadas, liberando a forma agliconada que pode se difundir pela membrana e sofrer a metabolização celular (NÉMETH et al., 2003; DAY et al. 2000). A hidrólise para a forma aglicona pelas bactérias ou pelos enterócitos é crucial para a eficiente absorção da quercetina glucosídeo pelo trato intestinal. Um esquema representativo da absorção da quercetina gluconada está exposto na figura 8.

Após a absorção, a quercetina é convertida em metabolitos conjugados antes de entrar em circulação. Os principais conjugados do flavonóide presentes no plasma são: 3'-O- $\beta$ -D-glucuronido de quercetina (Q3'GA) e 4'-O- $\beta$ -D-glucuronido de quercetina (Q4'GA), e ambos possuem considerável atividade (WILLIAMSON et al., 2005).

Quanto à distribuição nos tecidos, recentes estudos observaram concentrações de quercetina nos pulmões, testículos, rins, timo, coração, fígado (de BOER et al. 2005). Como a maioria dos trabalhos usam a quercetina na sua forma agliconada, é difícil encontrar relatos que citam a quercetina detectada no cérebro, porém trabalhos têm citado a capacidade da quercetina em atravessar a barreira hematoencefálica (RANGEL-ORDÓÑEZ et al., 2010; YODIM et al., 2004). A eliminação urinária da quercetina não é a principal via de excreção em humanos e

cobaias. Uma parte substancial dos metabolitos pode ser excretada na bile (MUROTA; TERAQ, 2003). A quercetina e seus metabólitos podem sofrer fermentação microbiana no colón, gerando ácidos fenólicos e CO<sub>2</sub>, que são excretados na respiração (ABRAHAMSE; KLOOTS; van AMELSVOORT, 2005).

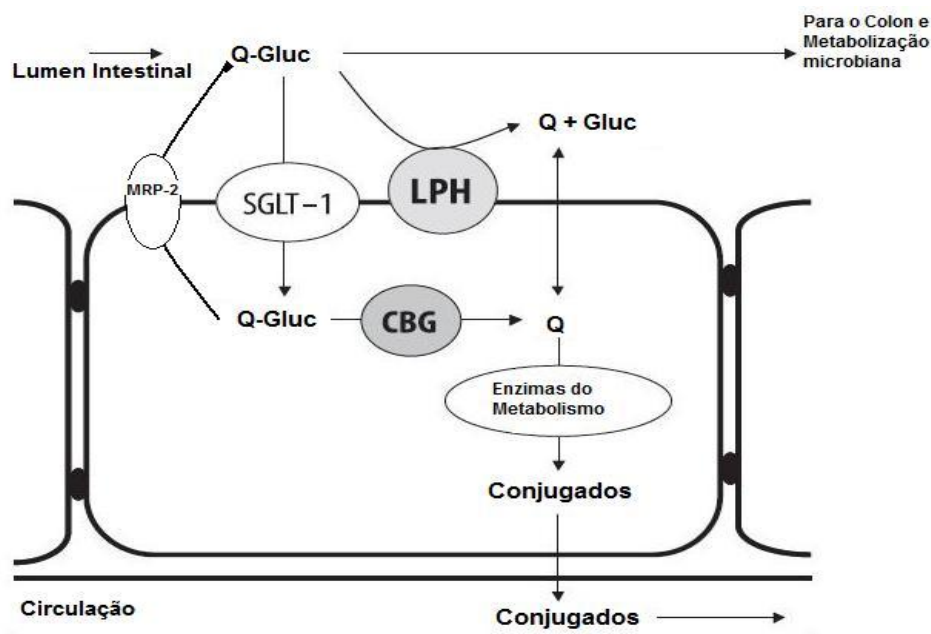


FIGURA 8 – MODELO DE ABSORÇÃO DA QUERCETINA NO INTESTINO DELGADO.

FONTE: adaptado de NÉMETH et al.(2003) e WALGREN et al. (2000).

NOTA: Quercetina glucosilada (Q-Gluc) é ingerida pela dieta, chegando intacta ao intestino, lá é absorvida pelo transportador de glucose dependente de sódio (SGLT-1), ou excretada pela proteína de resistência multidroga do tipo 2 (MRP-2). Também pode sofrer ação da lactase *phlorizin* desidrogenase liberando a forma agliconada (Q) que se difunde passivamente pela membrana do enterócito. Na célula a Q-Gluc é catalizada pela  $\beta$ -glucosidase citosólica (CBG) liberando Q. A forma agliconada é metabolizada e os conjugados irão para a circulação exercer sua atividade.

A baixa biodisponibilidade da quercetina e altas concentrações dos metabolitos indicam que ocorre metabolismo de primeira passagem no fígado e intestino, e a alta concentração da quercetina conjugada observada na bile, corroboram para um potencial de recirculação entero-hepático (ADER; WESSMANN; WOLFFRAM, 2000; OLIVEIRA; WATSON; GRANT, 2002; LIU et al., 2003).

Após a ingestão de quercetina (100 mg), foram observados um tempo de meia-vida de 31-50 horas, com picos plasmáticos em 30 minutos a 8 horas após o tratamento (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001). Quanto aos metabolitos, a meia-vida foi de 11-28 horas, indicando que os mesmos podem atingir um nível considerável no plasma após suplementação repetida de quercetina (MANACH et al., 2005; HOLLMAN; KATAN, 1997). Os dados de diferentes estudos de

biodisponibilidade da quercetina estão expostos na tabela 2.

TABELA 2 – ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE DA QUERCETINA

Fonte	Dose	Tmax	Conc. no plasma	Excr. Uninária	T½ vida
		horas	µmol/L	% da ingestão	eliminação horas
Quercetina pura	4 g		< 0,33	<1	
Cebolas fritas	64 mg eq Q	2,9	0,65		16,8
Cebolas	68 mg eq Q	0,7	0,74		28,0
Maçãs	107 mg eq Q	2,5	0,3		23,0
Rutina pura	100 mg eq Q	9,3	0,3		
Cebolas	186 mg eq Q	1,3-1,9	2,18	1,11	
Cebolas	50 mg eq Q	2	0,83		
Quercetina glucosideo 4'-	150 mg	<0,5	3,5		21,6
Rutina pura	190 mg	6	0,18		28,1
Quercetina glucosideo 3'-	156 mg	0,6	5	3,6	18,5
Quercetina glucosideo 4'-	160 mg	0,45	4,5	3,1	17,7
Rutina pura	500 mg	4-7	0,13-0,73		
Quercetina pura	8/20/50 mg	2/2,7/4,9	0,14/0,22/0,29		17/17,7/15
Rutina pura	8/20/50 mg eq Q	6,5/7,4/7,5	0,08/0,16/0,30		
Cebolas	100 mg eq Q	0,68	7,6	6,4	10,9
Quercetina glucosideo 4'-	100 mg eq Q	0,7	7,0	4,5	11,9
Chá de trigo sarraceno	200 mg eq Q	4,3	2,1	1,0	10,3
Rutina pura	200 mg eq Q	7	1,1	0,9	11,8
Cidra de maçã (1,1 L)	1,6 mg eq Q	0,66-1	0,14		
Quercetina pura	0,14 mg/kg	0,5	0,15-0,42	2,9-7	

FONTE: Adaptado de MANACH et al. (2005)

NOTA: Tmax, tempo da concentração máxima atingida no plasma. eqQ, equivalentes de quercetina.

Como observado na tabela 2, os valores de doses, concentrações, tempo de  $\frac{1}{2}$  vida e outros parâmetros farmacocinéticos ainda não estão bem estabelecidos, o próprio Manach e colaboradores em 2005 ao revisar 97 estudos de biodisponibilidade relata que temos uma grande variação destes dados, visto que de um flavonóide para outro ocorre diferenças de absorção, disponibilidade e excreção. Por exemplo, nesta revisão foi demonstrado que ao ingerir em média 50 mg de agliconas de quercetina temos uma concentração plasmática de 0 a 4  $\mu\text{mol/L}$ . Já Walle, Walle e Halushka em 2001 encontraram após uma ingestão oral de 100 mg de agliconas de quercetina a concentração plasmática de 890 nmol/L após 30 minutos e 1160 nmol/L após 8 horas.

No trabalho realizado por Egert et al. 2008, 35 voluntários sadios foram suplementados com 50, 100 e 150 mg de quercetina por 2 semanas. As concentrações plasmáticas foram respectivamente de 145 nmol/L, 217 nmol/L e 380 nmol/L, não afetando a capacidade antioxidante, oxidação da lipoproteína LDL, inflamação ou metabolismo em geral. Quanto a toxicidade, a quercetina é bem tolerada e reconhecida como segura em doses orais de até 1000 mg/dia ou em uma dosagem de 756 mg/dia via intravenosa (HARWOOD et al. 2007).

Por isso faz-se necessário uma melhor padronização de testes para a determinação exata dos parâmetros farmacocinéticos da quercetina e flavonóides em geral, desta forma os ensaios *in vitro* e *in vivo* poderão se basear com mais confiabilidade nestes dados para a determinação da dose segura e eficaz no tratamento e prevenção de doenças.

### 2.5.3 Quercetina e Câncer

A quercetina e outros flavonóis têm atraído muita atenção como agentes de alto potencial anti-câncer. Vários trabalhos sobre o efeito quimiopreventivo e anti-genotóxico foram publicados. Os efeitos preventivos das neoplasias têm sido atribuídos a vários mecanismos antioxidantes; como quelante de metais (SESTILI et al., 1998), seqüestro de espécies reativas (terc-butil-alcóxido) (AHERNE ; O'BRIEN, 2000) e aumento dos níveis de glutathione (MYHRSTAD et al., 2002). Os flavonóides



também podem atuar inibindo enzimas que ativam vias de sinalização pró-tumor, como por exemplo: PI3K, EGFR e PKC (AGULLO et al., 1997; VARGAS; BURD, 2010; JAGTAP et al., 2009; MOON et al. 2006).

Um aspecto observado para a quercetina é a sua dúbia característica nos processos redox, dependendo da sua concentração ela pode atuar como antioxidante e também como pró-oxidante. O flavonóide é capaz de reagir com espécies reativas de oxigênio (EROS), diminuindo o dano oxidativo no DNA, desta forma uma menor oxidação do DNA, leva a uma prevenção do processo tumorigênico (MUROTA; TERAQ, 2003). Recentemente foi visto em células Caco-2 (adenocarcinoma coloretal) que doses de 1  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina levou a diminuição de quebras no DNA, porém em doses de 100  $\mu\text{mol/L}$  foi observado um aumento (MIN; EBELER, 2009), ainda neste trabalho, os autores observaram que a quercetina em ambas concentrações induziu a expressão da 8-oxiguanina DNA glicosilase (hOGG1). A hOGG1 é uma enzima que está envolvida no reparo do DNA (MIN; EBELER, 2009), sugerindo que o flavonóide em baixas concentrações previne o dano e aumenta o reparo do DNA. Em altas doses (acima de 50  $\mu\text{mol/L}$ ) a quercetina tem efeitos pró-oxidante e citotóxico, característica promissora na terapia tumoral, uma vez que os efeitos pró-oxidantes têm uma tendência de iniciar a apoptose nas células, contribuindo no tratamento do câncer (THANGASAMY et al., 2007; THANGASAMY et al., 2008).

Estudos com células H4IIE (hepatoma murino) pré-encubadas com quercetina em concentrações baixas (10 a 25  $\mu\text{mol/L}$ , por 1 hora) foram capazes de proteger os efeitos oxidantes do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) – 500  $\mu\text{mol/L}$  por 2 horas –, como quebra de DNA e diminuição da atividade da caspase-3, porém com doses acima de 50  $\mu\text{mol/L}$  o flavonóide induziu citotoxicidade, quebras no DNA e ativação de caspase-3, mostrando que a dose é de extrema importância na citoproteção e citotoxicidade (WÄTJEN et al., 2005).

O efeito citoprotetor e quimiopreventivo (doses plasmáticas de 1 – 40  $\mu\text{mol/L}$ ) pode ser obtido diretamente da dieta, sugerindo que a ingestão de alimentos ricos em quercetina pode ajudar na prevenção do câncer (EGERT et al. 2008).

A quercetina vem chamando a atenção da comunidade científica já há algum tempo, um trabalho interessante de citar é o estudo de fase I com este flavonóide publicado em 1996. Neste trabalho Ferry et al. (1996), avaliaram a farmacocinética e efeito da quercetina (doses de 200 a 400  $\mu\text{mol/L}$ ) em 51 pacientes com vários tipos

de câncer não responsivo a quimioterapia convencional. Os resultados mostraram uma boa margem de segurança do flavonóide, diminuição de marcadores tumorais (CA-125 e  $\alpha$ -fetoproteína) e inibição da atividade tirosina quinase linfocitária *in vivo*, sendo o primeiro relato de estudo de fase I com inibidores de tirosina quinase, porém não se sabe se é por esse mecanismo que a quercetina promove seu efeito anti-proliferativo.

São inúmeros trabalhos que mostram o potencial anti-proliferativo e antitumoral da quercetina. A partir deste ponto serão evidenciados os efeitos em linhagens tumorais, que é o foco de estudo desta dissertação de mestrado.

A quercetina foi capaz de reduzir a proliferação celular e viabilidade de células de glioma U138MG, provocou morte celular por apoptose e necrose, aumento da porcentagem de células na fase G2 no ciclo celular e diminuição do índice mitótico (BRAGANHOL et al., 2006). Nesse estudo as células de glioma foram tratadas pelo flavonóide em três tempos (24, 48 e 72 horas) e a dose de quercetina foi de 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{mol/L}$ . Neste trabalho também foi observado que o flavonóide exerceu um efeito protetor em células neuronais murinas (100  $\mu\text{mol/L}$  por 24 horas) quando expostas a privação de oxigênio e glicose.

Em 2009, Zamin et al., utilizaram o modelo de células C6 de glioma murino e testaram em conjunto a ação de resveratrol e quercetina. Os autores observaram que o tratamento concomitante destes flavonóides, nas doses de 10 e 25  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente, provocou indução de apoptose nas células C6, porém quando o tratamento foi realizado com os flavonóides isolados não foi possível detectar a indução de apoptose. Em concomitância, os autores testaram os efeitos do tratamento em conjunto destes flavonóides em cultura primária de astrócitos murinos e observaram um efeito seletivo do resveratrol em gliomas.

Outro estudo visando o efeito da quercetina em células de glioma humano foi feito por Kim et al. (2008), neste trabalho foi avaliado a diminuição da proliferação das células A172 de maneira dose e tempo dependente atribuído a morte celular por apoptose. A quercetina (dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  – por 12 horas) induziu despolarização de membrana mitocondrial, aumento na atividade da caspase-3 e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família das IAP (*Inhibitors of apoptosis proteins*). Dentre elas, estão a XIAP e a survivina, suas expressões foram relatadas na maioria das células tumorais (AMBROSINI; ADIDA; ALTIERI, 1997; FONG et al., 2000), e o aumento na expressão destas proteínas está associado com um pior

prognóstico e recidivas (FUKUDA; PELUS, 2006; TAMM et al., 2000). No glioma o aumento na expressão destas proteínas está relacionado com a progressão do baixo para o alto grau de invasividade (CHAKRAVARTI et al., 2002; KAJIWARA et al., 2003).

No trabalho realizado por Jeong et al. (2009), utilizando modelo de carcinoma mamário (SK-Br3, MDA-MB-453, MDA-MB-231) e testando baixas doses de quercetina (0 a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) por 96 horas. Os autores observaram que este tratamento inibiu a progressão específica do ciclo celular na fase G1. Os autores ainda relatam que a escolha de doses baixas para o trabalho reflete o fato de que após a ingestão de alimentos ricos em quercetina, o pico plasmático fica em cerca de 10  $\mu\text{mol/L}$ .

Quando testado o efeito da quercetina sobre a proliferação e apoptose de células HEN1 (carcinoma de nasofaringe humana), usando ensaio do MTT, citometria de fluxo e expressão de caspases, também foi observado parada no ciclo celular em G2-M e aumento da atividade de caspase-3 relacionado a um aumento de apoptose dessas células quando comparado com o controle. Nesse trabalho as doses capazes de diminuir em 50% a viabilidade ( $\text{IC}_{50}$ ) foram de 98 e 85  $\mu\text{M}$  respectivamente em 48 e 72 horas (ZHANG, CUI, CAO, 2008).

A quercetina foi capaz de induzir parada de proliferação em linhagem celular de osteosarcoma humano (HOS) e indução de morte por apoptose através da ativação de caspase-3, porém antes da indução de apoptose, o tratamento com o flavonóide causou parada do ciclo celular na fase G1-S, levando a diminuição de ciclina D1 (SUH et al., 2010). A ciclina D1 é responsável pelo avanço da fase G1 do ciclo celular para a fase S (TASHIRO, TSUCHIYA, IMOTO, 2007).

Em linhagem celular de astrocitoma grau III (MOGGCCM) foi testado o tratamento padrão com temozolomida concomitante com quercetina. Neste estudo a temozolomida sozinha foi capaz de induzir apoptose e quercetina mostrou ser um potente indutor de necrose nesta linhagem. Os dois fármacos em terapia combinada foram capazes de uma maior efetividade de morte quando comparados individualmente, induziram a liberação do citocromo c, aumentaram a atividade da caspase-3 e inibiram o fenótipo migratório das células, revelando um efeito sinérgico dos compostos bioativos com fármacos convencionais (JAKUBOWICZ-GIL et al. 2010).

#### 2.5.4 Quercetina e MMPs

Além de atuar inibindo diversos processos relacionados com a proliferação celular, a quercetina também pode regular a atividade e expressão de MMPs. Um estudo realizado em 2006 com células de câncer de próstata (PC-3) tratadas com quercetina demonstraram uma diminuição na expressão e atividade de MMPs 2 e 9 de maneira dose dependente (VIJAYABABU et al., 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a quercetina e outros compostos polifenólicos podem inibir a invasão celular por inibir as MMPs (ANNABI et al., 2002; LIN et al., 2008; ZHANG, HUANG, XU, 2004) mas até o presente não há correlação na literatura se a quercetina pode inibir as enzimas MMPs via modulação do gene *RECK*. Para ilustrar, podemos citar um estudo feito com dois flavonóides (quercetina e isorhamnetina) isolados de *Salicornia herbacea*, uma halófita que cresce em pântanos de água salgada ao longo da costa ocidental da Coreia. Neste trabalho foi demonstrado que ambos os flavonóides inibiram a atividade de MMP 2 e MMP 9 e levaram à um aumento na expressão de TIMP 1 (níveis de proteína) em células HT 1080 de fibrossarcoma humano (KONG et al., 2008).

Garcia Mediero et al. (2005) estudaram o efeito da dieta do mediterrâneo, rica em polifenóis, em células MB-49 (câncer vesical murino). Foram testados os seguintes compostos: ác. tânico, ác. gálico, quercetina, rutina, morina e resveratrol. Todos apresentaram uma melhor inibição na proliferação celular no tempo de 72 horas de tratamento e todos os compostos conseguiram inibir a expressão do RNA mensageiro de *MMP 9*. A quercetina nesse trabalho foi um dos compostos que tiveram uma maior taxa de inibição de *MMP 9*.

Uma das vias de sobrevivência do glioma já citadas nesta dissertação é a da Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Foi descrito que a ativação de PI3K/AKT é essencial para a migração celular e conseqüentemente sua atuação leva a uma elevada produção de MMPs (KIM et al., 2001). No trabalho de Hwang et al. (2009) a quercetina inibiu a fosforilação de AKT, diminuiu as atividades das enzimas PI3K e MMP-9 e diminuiu a invasividade das células JB6P+ (células epidérmicas murinas), levando os autores a sugerir que o flavonóide atua inibindo diretamente PI3K, desta forma contribuindo para o fenótipo observado.

Em modelos de isquemia cerebral *in vivo*, onde há geração de espécies

reativas de oxigênio e nitrogênio ocorre uma série de danos na barreira hematoencefálica. Neste local ocorre permeabilidade da barreira e o acúmulo de espécies reativas induz a atividade de MMPs. A administração da quercetina inibiu a atividade de MMP 9 após 24 e 48 horas depois da isquemia, melhorando a integridade da MEC, sugerindo que o flavonóide pode ser um candidato terapêutico para a melhora do processo isquêmico (LEE et al., 2010).

A quercetina também inibiu expressão e atividade de MMP 9 e MMP 12 *in vivo*. No trabalho de Ganesan et al. (2010), ratos tiveram uma inflamação pulmonar induzida com LPS (lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias gram-negativas) e no local ocorre um recrutamento de células inflamatórias, essas células quando estimuladas produzem MMPs que podem degradar tecidos e causar um enfisema. Os ratos estimulados com LPS e depois tratados com quercetina apresentaram uma prevenção na progressão do enfisema, redução: do estresse oxidativo, inflamação e expressão de MMP 9 e 12.

Ao validar um novo método para detecção de inibição de MMP 2 e MMP 9 *in vitro* (eletroforese capilar). Os autores usaram como padrões vários compostos naturais, entre eles a quercetina. Neste estudo, 600  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina foi capaz de inibir a atividade de MMP 2 em 39,3% e de MMP 9 em 34,8% (HAI et al., 2011). Ainda, testando o potencial inibitório da quercetina em sistema livre de células, Saragusti et al. (2010) observou um perfil de inibição de MMP-9 dose dependente, sendo que a  $\text{IC}_{50}$  (ou a quantidade de flavonóide capaz de inibir 50% da atividade da protease) foi de 22  $\mu\text{mol/L}$ . Neste trabalho foi mostrado pela primeira vez a interação direta da quercetina com a enzima, por técnicas de modelagem molecular, indicando a formação de dois complexos diferentes de ligação quercetina-MMP-9.

### 3 OBJETIVOS

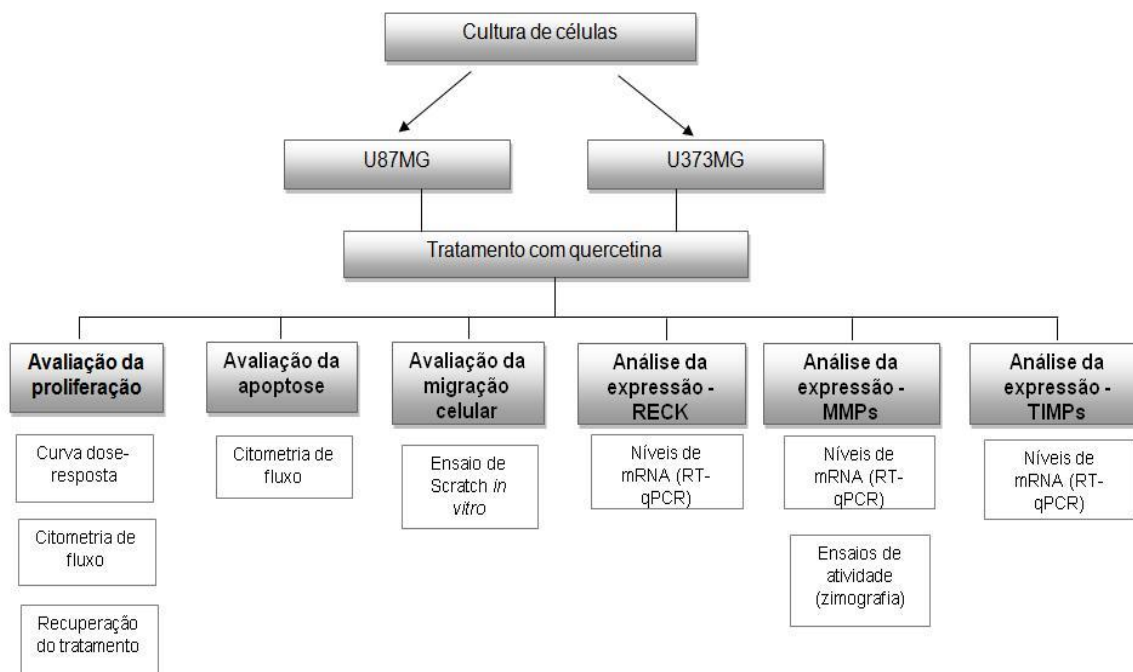
#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a ação antitumoral da quercetina e sua ação como reguladora de MMPs, o objetivo geral deste trabalho é caracterizar os efeitos da quercetina em modelo de glioma humano, avaliando especificamente aspectos de viabilidade, proliferação, migração e a possível modulação da expressão e atividade de MMPs e seus inibidores.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da quercetina na proliferação de linhagens celulares de glioma humano U87MG e U373MG, utilizando curva dose-resposta;
- Verificar a indução de apoptose e parada de proliferação das células de glioma mediada pelo flavonóide estudado, através de citometria de fluxo;
- Avaliar a migração celular após o tratamento com o flavonóide, através do ensaio de Scratch *in vitro*;
- Determinar a capacidade de recuperação das células de glioma após o tratamento com quercetina, através do método do cristal violeta;
- Analisar a modulação da expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos, bem como de *MMPs* e *TIMPs* em células de glioma após o tratamento com quercetina, avaliando os níveis de mRNA por RT-qPCR.
- Analisar a modulação da atividade de MMPs em células de glioma após tratamento com quercetina, realizando ensaios de zimografia;

## 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR

#### 5.1.1 Esterilização dos materiais

Todos os materiais e vidraria utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas automáticas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave da marca Fanem a 120°C, durante 40 minutos e sob pressão de 1 atm. Após o processo de esterilização, o material foi colocado para secar em estufa Fanem (Modelo Orion 505) a 50°C.

### 5.2 SOLUÇÕES, MEIO DE CULTURA E LINHAGENS CELULARES

#### 5.2.1 Solução salina fosfato tamponada A (PBSA)

A solução salina fosfato tamponada (PBSA) foi preparada como uma solução estoque concentrada 5x, sendo que esta solução é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 7,35 mmol/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O pH da solução foi ajustado para 7.4, e depois ela foi submetida a esterilização em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

#### 5.2.2 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA é constituída de 137 mmol/L de NaCl, 5.4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,44 mmol/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,



2.3 mmol/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/% de tripsina, com o pH ajustado para 7,4. O indicador de pH é o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 5.2.3 Solução de quercetina

A solução estoque de quercetina (Sigma Aldrich) foi preparada na concentração de 100 mmol/L, diluída em DMSO (dimetilsulfóxido), e armazenada a temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Para os experimentos, a solução foi diluída em DMSO em alíquotas de 50 mmol/L.

### 5.2.4 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI)

A solução desnaturante de iodeto de propídeo foi preparada em 200 mL de PBSA usando 50  $\mu\text{g/mL}$  de PI (estoque: 1 mg/mL de água ultra-pura); 0,1% m/v de citrato de sódio; 0,1% v/v de Triton X-100. Sendo armazenado a  $4^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz.

### 5.2.5 Solução de iodeto de propídeo não desnaturante

A solução de PI não desnaturante foi preparada em 100 mL de PBSA usando 10  $\mu\text{g/mL}$  de PI (a partir do estoque 1 mg/mL). A solução foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz.

### 5.2.6 Tampão de ligação Anexina V- FITC

O tampão de ligação de Anexina V-FITC foi preparado em 300 mL de HEPES 10 mmol/L (pH 7.4) contendo NaCl 150 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L e CaCl<sub>2</sub> 1,8 mmol/L. O tampão foi conservado a 4°C.

### 5.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM alta gluucose (Cultilab), reconstituído em água ultra-pura e com pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio é realizado pela adição de NaHCO<sub>3</sub> estéril (autoclavado) e o tamponamento do meio é realizado utilizando HEPES (Sigma Aldrich). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de 0,22 µm sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEN alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB – Cultilab) e 50 µg/mL do antibiótico gentamicina (Neo Química).

### 5.2.5 Linhagens celulares

As linhagens utilizadas no trabalho foram as seguintes: (1) a linhagem U373MG de glioblastoma astrocitoma humano – grau III (POTEN; MACYNTIRE, 1969); (2) a linhagem U87MG de glioblastoma astrocitoma – grau IV (POTEN; MACYNTIRE, 1969).

### 5.2.6 Condições de cultivo

*In vitro*, as células de glioma desenvolveram-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis da Techno Plastic Products (TPP). Às garrafas foi adicionado o meio de cultura (DMEM alta glucose) suplementado com 10% de SFB e antibiótico. As células foram mantidas em estufa da marca Sanyo sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células na garrafa, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as linhagens de gliomas garrafa. Para o armazenamento das linhagens, as células, em geral numa quantidade de 10<sup>7</sup> células/mL, foram suspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 10% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

#### 5.3.1 Curva de tratamento: método do cristal violeta

Para a curva de tratamento, foram plaqueadas  $1.5 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços, e as placas foram deixadas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para que ocorra a adesão das células. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com quercetina, nas concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100 µmol/L. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os tempos de tratamento foram de 24, 48 e 72 horas (onde as células ficaram incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>), após os quais foi retirado o meio de cultura com o flavonóide, as células foram lavadas com PBSA, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos. Após este tempo, o metanol foi retirado e adiciona-se a solução de cristal violeta 0,2% diluída em etanol 2% durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos nucleicos das células aderidas e fixadas. Após 3 minutos, este foi retirado e foram realizadas lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após as lavagens, o cristal violeta foi eluído com solução de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN Infinite

200) utilizando filtro de 540 nm (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). Os resultados foram expressos em porcentagem de células aderidas (coradas) em relação ao controle (considerado como 100%).

## 5.4 ENSAIO PARA ANÁLISE DO CICLO CELULAR

### 5.4.1 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células em placas de plástico de 60 mm em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com quercetina nas concentrações de 0, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por um tempo de 48 horas ( $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ). A seguir, procedeu-se a coleta da amostra para análise, primeiramente coletou-se o sobrenadante. Após a retirada do meio, as células foram lavadas duas vezes com PBSA, sendo que o PBSA também foi adicionado ao tubo de coleta. As células aderidas foram tripsinizadas, e a suspensão obtida foi adicionada ao mesmo tubo anteriormente citado. O tubo contendo a amostra para análise foi centrifugado (3.000g por 3-4 minutos), e o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi ressuspense em 0,5 mL de PBS e as células foram fixadas com 4,5 mL de etanol 70%, mantido em gelo, nesta etapa as células fixadas podem ser mantidas a  $4^\circ\text{C}$  por até um mês até a análise.

Para a análise, as células foram centrifugadas (3.000g por 3-4 minutos), retirado o etanol 70%, o *pellet* foi lavado duas vezes com PBSA, o sobrenadante foi retirado com bastante cuidado e após as células foram ressuspensas em 0,3 mL de tampão hipotônico de iodeto de propídeo por 40 minutos. No aparelho FACScalibur (BD) os 10.000 eventos foram adquiridos usando como filtro de fluorescência FL2, e as análises foram feitas usando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo *software* WinMDI version 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

## 5.5 ENSAIO PARA ANÁLISE DA MORTE CELULAR

### 5.5.1 Análise de morte celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células em placas de plástico de 60 mm em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com quercetina nas concentrações de 0, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por um tempo de 48 horas ( $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ ). A seguir, procedeu-se a coleta da amostra para análise, primeiramente coletou-se o sobrenadante. Após a retirada do meio, as células foram lavadas duas vezes com PBSA, sendo que o PBSA também foi adicionado ao tubo de coleta. As células aderidas foram tripsinizadas, e a suspensão obtida foi adicionada ao mesmo tubo anteriormente citado. O tubo contendo a amostra para análise foi centrifugado (3.000 g por 2-3 minutos), e o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi ressuspenso em 0,2 mL de tampão de ligação Anexina V-FITC, as amostras foram centrifugadas (3.000 g por 3 minutos). O tampão de ligação foi retirado e sobre o *pellet* adicionou 100  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação contendo anexina V-FITC diluída (1:1000). As amostras foram incubadas no escuro, por no mínimo 30 minutos. Após foi adicionado 0,3 mL de PBSA e 20  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de propídeo não desnaturante logo antes da análise no citômetro de fluxo.

No aparelho FACScalibur (BD) os 10.000 eventos foram adquiridos usando os filtros FL1 (anexina V) e FL2 (iodeto de propídeo), e as análises foram feitas usando um gráfico do tipo *dot-plot* (eixo X: filtro FL1, eixo Y: filtro FL2) pelo *software* WinMDI version 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO

### 5.5.1 Método do cristal violeta

As células de glioma foram plaqueadas na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço em 2 placas de 24 poços. Após 24 horas de adesão o meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB foi retirado e adicionado o meio com o tratamento com quercetina nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas. Após o tratamento procedeu-se da mesma maneira como descrito no item 6.3.1 e foi medida a absorbância em 540 nm da placa número 1. As células que estavam na placa número 2 tiveram o meio de tratamento retirado e foram lavadas 2 vezes com PBSA, logo após foi adicionado meio de cultura e deixadas para recuperar a viabilidade por mais 48 horas. No tempo de 96 horas a placa 2 foi submetida a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (como descrito no item 6.3.1).

## 5.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

### 5.6.1 Ensaio de *Scratch in vitro*

As duas linhagens celulares de glioma humano foram plaqueadas em placas de plástico de 24 poços até atingirem a máxima confluência, após isso o meio de cultura foi retirado e com o auxílio de uma ponteira (*tip 200*) foi feito um risco contínuo pela superfície da placa e as células soltas foram retiradas com uma lavagem com PBSA (LIANG; PARK; GUAN, 2002). Em seguida foi adicionado o meio de tratamento com quercetina nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  pelo período de 24 e 48 horas. A condição controle foi feito com o veículo de diluição do flavonóide (DMSO). Nos tempos de 24 e 48 horas, o ensaio foi analisado em microscópio de contraste de fase (Olympus CK2) e as imagens foram capturadas com uma câmera digital (SONY) no aumento de 400x. As análises foram feitas medindo a largura do risco (em unidades arbitrárias – u.a) presente nas imagens através do *software* Photoshop versão 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Califórnia, EUA).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *RECK* (E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) *TIMPs* E *MMPs*

### 5.7.1 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com quercetina

#### 5.7.1.1 Extração e purificação do RNA celular

As células foram plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células por placa. As placas utilizadas foram as de 60 mm em meio DMEM alta glucose. As células foram incubadas por 24 horas em estufa nas condições de temperatura e atmosfera mencionadas anteriormente, para que ocorra a sua adesão nas placas. Após este tempo as células foram tratadas com as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina e incubadas em estufa novamente durante o tempo de 48 horas. Depois de transcorridos os tempos de tratamento as células foram desprendidas das placas com a solução de tripsina-EDTA (500  $\mu\text{L}$  por placa), sendo adicionado cerca de 1 mL de meio DMEN alta glucose para que fiquem em suspensão, e transferidas para tubos de centrifuga 15 mL.

As suspensões de células nos tubos foram submetidas à centrifugação durante 3 minutos a 3.000 g, e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado do tubo para não remover o *pellet* de células. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS, submetidas novamente à centrifugação por 3 minutos a 3000 g, e retirado cuidadosamente o sobrenadante. Os tubos podem ser armazenados a  $-70^\circ\text{C}$  até a extração do RNA ser realizada.

O RNA celular foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Basicamente, a tecnologia se baseia na propriedade de ligação seletiva do RNA com mais de 200 nucleotídeos à membrana de sílica presente na mini-coluna. Primeiramente as células foram lisadas e homogeneizadas com o tampão RLT ( $\beta$ -mercapetanol / guanidina-tiocianato), além de lisar as células este tampão inativa as RNases presentes na amostra, deixando o RNA intacto. Após a lise, foi adicionado Etanol 70%, necessário para fornecer condições adequadas para a ligação do RNA total à membrana de sílica da coluna. Após várias lavagens com diferentes tampões

(RW1 e RPE) sais, metabólitos e outros debris celulares são removidos, ficando o RNA purificado na coluna, onde o mesmo foi finalmente eluído com água livre de RNAses, podendo ser imediatamente quantificado, verificado a integridade ou armazenado a -80°C. A quantificação foi feita através da medida de absorbância da amostra em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific) e a integridade do RNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. Esta metodologia prevê um enriquecimento do mRNA, já que a maioria dos RNAs com menos de 200 nucleotídeos ( como por exemplo, 5S rRNA, tRNA) são seletivamente excluídos.

#### 5.7.1.2 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar seguiu as especificações da metodologia utilizada – ImProm II *Reverse Transcription System* (Promega), um kit convencional que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para uma síntese de DNA a partir de de um mRNA poli (A). Detalhadamente, 1 µg de RNA total extraído foi transferido para um tubo de 0,5 mL com seu volume final ajustado para 6,5 µL, foi então adicionado 1 µL de enzima DNase I, 1 µL de Tampão para a enzima já suplementado com cloreto de magnésio e 0,5 µL de inibidor de RNase (RNase Out). Os tubos foram incubados em termociclador (Eppendorf) a 37°C por 10 minutos e depois a 70°C por 5 minutos para inativação da enzima. Após o tratamento com DNase I adicionou-se 1 µL de Oligo(dT) para o anelamento com a cauda poli (A) e o tubo foi incubado a 70°C por 5 minutos e rapidamente deixado para resfriar em gelo por mais 5 minutos. Após esta etapa, foi adicionado em cada tubo 10 µL da mistura de reação e incubado a 25°C por 5 minutos. A mistura teve a seguinte composição:



TABELA 3- COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO PARA SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

Componente	Quantidade
Água livre de RNases	0,5 µL
ImProm II Tampão de Reação 5x	4 µL
Cloreto de Magnésio 5 mmol/L	4 µL
Mix de dNTPs (0,5 mmol/L de cada)	1 µL
RNasin Inibidor de RNase	0,5 µL
ImProm II Transcriptase reversa	1 µL

FONTE: o autor (2011)

Após o tempo de incubação com a mistura de reação, a síntese propriamente dita foi realizada em termociclador (Eppendorf) em 42°C por 60 minutos, após a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. Depois de pronto o cDNA recém sintetizado foi diluído 1:3 com água livre de RNase e armazenado a -80°C.

#### 5.7.1.3 Avaliação da modulação da expressão gênica

O cDNA sintetizado foi submetido a análise da expressão gênica utilizando a metodologia de PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando iniciadores específicos para o gene *RECK* e seus transcritos alternativos (B e D), para os genes de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP* e também para os genes dos inibidores *TIMP-1* e *TIMP-2* (TABELA 4).

A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Corbett Reserch) utilizando os reagentes do *Rotor-Gene SYBR Green PCR kit* (Qiagen). A mistura de reação teve um volume final de 18 µL e sendo constituída por: 4,5 µL de cDNA 1:30; 4,5 µL dos iniciadores F (*forward*) e R (*reverse*); e 9 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix* (composto pela HotStarTaq Plus DNA polimerase; Tampão da polimerase; mistura de dNTPs; água livre de RNase). Para realização das reações as amostras foram incubadas a 95°C durante 5 minutos. Após este tempo, foram realizados cerca de 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C em cada

ciclo. A dissociação foi realizada variando-se a temperatura de 60°C a 90°C. Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno como *hGAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *hHMBS* (hidroximetilbilano sintase) e *hHPRT* (hipoxantina fosforibosiltransferase). Esta normalização foi realizada pelo software geNorm 3.4 (desenvolvido por VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

TABELA 4 – INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR

Gene / Concentração	Sequência
<b>RECK A</b> (600 nmol/L)	F: 5'-ATGCACTGTATAGACCTCCAGAAGTC-3' R: 5'-CAGTCAATACTAAAGGATGTTCCATGA-3'
<b>RECK B</b> (600 nmol/L)	F: 5'-TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA-3' R: 5'-CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC-3'
<b>RECK D</b> (600 nmol/L)	F: 5'-AATGAGGAACCCAACGGATATGT-3' R: 5'-TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT-3'
<b>MMP-2</b> (600 nmol/L)	F: 5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGATG-3' R: 5'-CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT-3'
<b>MMP-9</b> (200 nmol/L)	F: 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' R: 5'-GATTTGACTCTCCACGCATCT-3'
<b>MT1-MMP</b> (600 nmol/L)	F: 5'-GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA-3' R: 5'-TCGAACATTGGCCTTGATCTC-3'
<b>TIMP-1</b> (600 nmol/L)	F: 5'-CCGCAGCGAGGAGTTTCTC-3' R: 5'-GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA-3'
<b>TIMP-2</b> (600 nmol/L)	F: 5'-CGACATTTATGGCAACCCTATCA-3' R: 5'-GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC-3'
<b>hGAPDH</b> (400 nmol/L)	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
<b>hHMBS</b> (200 nmol/L)	F: 5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3' R: 5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC-3'
<b>hHPRT</b> (200 nmol/L)	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

FONTE: o autor (2011)

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES (MMPs)

### 5.8.1 Zimografia gelatinosa

As células de glioma (U373MG e U87MG) foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por placa (60 mm) nas condições já mencionadas anteriormente. Após 24 horas de adesão, as células foram lavadas três vezes com DMEM alta glucose livre de soro fetal bovino. Logo em seguida as células foram submetidas ao tratamento com quercetina em DMEM glucose sem soro, suplementado com albumina do soro bovino (BSA 0,1% Sigma), nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas. O meio de cultura foi então coletado e submetido à centrifugação por 5 minutos a 1000g por 2x (trocando o tubo a cada centrifugação).

As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo Método de Bradford. Alíquotas de 25  $\mu\text{g}$  de proteína foram incubadas com tampão de amostra contendo SDS livre de agentes redutores. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 10% com os géis contendo 1 mg/mL de gelatina. Após a eletroforese o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% por 30 minutos sob agitação e então incubados em tampão contendo 0,05 mol/L Tris-HCl (pH 8,0), 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  e 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnCl}_2$  16 a 17 horas. Os géis foram fixados e corados utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), dissolvido em solução água:metanol:ácido acético glacial 6:3:1. A remoção do excesso de corante foi feita utilizando solução água:metanol:ácido acético glacial 8:1:1. A atividade proteolítica foi observada pelas bandas não coradas nos géis analisada através do programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA. Disponível na web).

## 5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Para a comparação de dados de uma variável e dois grupos experimentais foi utilizado o teste t. Já a comparação de

dados de uma ou mais variáveis com dois ou mais grupos experimentais utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguidos do teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de  $p$  menor que 0,05.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Diversos estudos já demonstraram a ação anti-proliferativa do flavonóide quercetina em vários tipos tumorais (BRAGANHOL et al., 2006; ZAMIN et al., 2009; KIM et al., 2008; JEONG et al., 2009; ZHANG, CUI, CAO, 2008). Neste trabalho nós testamos a influência da quercetina sobre a proliferação de células de glioma humano.

Foram utilizados nesta etapa três linhagens de glioma humano que correspondem a graus diferentes de progressão maligna: linhagem U87MG – astrocitoma grau IV, linhagem U373MG – astrocitoma Grau III e a linhagem U343MG - astrocitoma Grau III. As células de glioma humano foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações do flavonóide em diferentes tempos. Para esse objetivo foi utilizado o método do cristal violeta, que cora os ácidos nucléicos das células aderidas e a leitura da eluição deste corante em 540 nm indica a quantidade de células presentes em cada condição (KUENG et al. 1989). O resultado está expresso como o valor de porcentagem de células em relação ao controle do experimento (células tratadas somente com o veículo de diluição do flavonóide) como 100%.

#### 6.1.1 Proliferação celular – U373MG

A avaliação da proliferação celular indicou uma diminuição do número de células na linhagem U373MG (astrocitoma grau III) pela ação da quercetina de maneira dose e tempo dependente (FIGURA 9 – A e B). Os efeitos estatisticamente significativos foram observados após o tempo de 24 horas de exposição ao flavonóide somente na dose de 100  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, sendo essa diminuição de 21% em relação ao seu respectivo controle (DMSO); após 48 horas de tratamento com quercetina na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$ , a queda na proliferação em relação ao

controle foi de 24%; já no maior tempo de tratamento (72h) e na maior concentração utilizada de flavonóide (100  $\mu\text{mol/L}$ ), a redução na viabilidade celular foi de 45%. O gráfico na figura 9 – B demonstra a taxa de proliferação das células U373MG que foram mantidas na condição controle nos diferentes tempos do experimento.

#### 6.1.2 Proliferação celular – U343MG

A diminuição de proliferação após tratamento com quercetina foi dose e tempo dependente (FIGURA 9 – C e D). Os efeitos começaram a aparecer no tempo de 24 horas de exposição ao flavonóide e ficaram bem pronunciados no tempo de 72 horas. Em 24 horas, o tratamento com a dose de 100  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina promoveu uma diminuição da proliferação de 21% em relação ao controle (DMSO); em 48 horas de exposição com 50  $\mu\text{mol/L}$  do flavonóide foi observado uma diminuição da proliferação de 20% em relação ao controle; em 72 horas com a maior dose testada a redução da proliferação celular foi de quase 50% em relação ao controle. O gráfico na figura 9 – D representa a proliferação das células U343MG na condição controle nos diferentes tempos do experimento (24, 48 e 72 horas), demonstrando regularidade na proliferação celular, comprovando a adequação das células às condições experimentais.

#### 6.1.3 Proliferação celular – U87MG

No glioblastoma multiforme (GBM – grau IV), representado pela linhagem U87MG, foi observada uma diminuição da proliferação celular após o tratamento com quercetina de maneira dose e tempo dependente (FIGURA 9 – E e F). Os efeitos significativos foram observados a partir do tempo de tratamento de 24 horas e na concentração de 100  $\mu\text{mol/L}$  do flavonóide, essa redução na proliferação celular em relação ao controle (DMSO) foi de 20%; após 48 horas de tratamento com quercetina, a dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  mostrou ser capaz de diminuir a proliferação em

15%, já o tratamento com a concentração de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina promoveu uma queda na proliferação de 35% quando comparado com seu controle; após 72 horas de tratamento com quercetina e com a maior dose testada (100  $\mu\text{mol/L}$ ) a diminuição da proliferação celular foi de 63%. O gráfico na figura 9 – F representa a proliferação das células na condição controle em relação aos diferentes tempos do experimento, especificamente nesta linhagem podemos notar que a proliferação em 72 horas foi de 175% em relação ao tempo de 24 horas, indicando o potencial agressivo desta célula.

#### 6.1.4 Comparação da proliferação entre as linhagens de glioma analisadas

Ao analisarmos em conjunto nossos dados podemos perceber que as linhagens grau III (U373MG e U343MG) respondem ao tratamento com quercetina de maneira bem parecida, os dados de redução da proliferação são bem próximos um do outro, o perfil de proliferação das células que foram mantidas na condição controle também é parecido (após 72 horas do experimento temos uma proliferação em relação ao tempo de 24 horas de 78% e 87%, respectivamente). Já para a linhagem que representa um GBM grau IV (linhagem U87MG), bem mais agressiva, tivemos uma surpresa ao constatar uma sensibilidade dessas células à quercetina já na dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  após 48 horas de tratamento, o que não foi observado para ambas as linhagens grau III, sugerindo uma maior resistência das células grau III ao tratamento com quercetina em comparação com a linhagem de glioma grau IV. No gráfico que mostra a proliferação das células U87MG na condição controle (figura 9 – F) podemos ter uma idéia da alta taxa de crescimento da célula U87MG (175% no tempo de 72 horas em relação ao tempo de 24 horas).

A tabela 5 mostra os dados comparativos de viabilidade celular após o tratamento com quercetina das três linhagens utilizadas neste estudo. Nossos dados, em conjunto, mostram que a quercetina é capaz de diminuir a proliferação das células de glioma de maneira dose e tempo dependente, corroborando os dados publicados de outros autores.

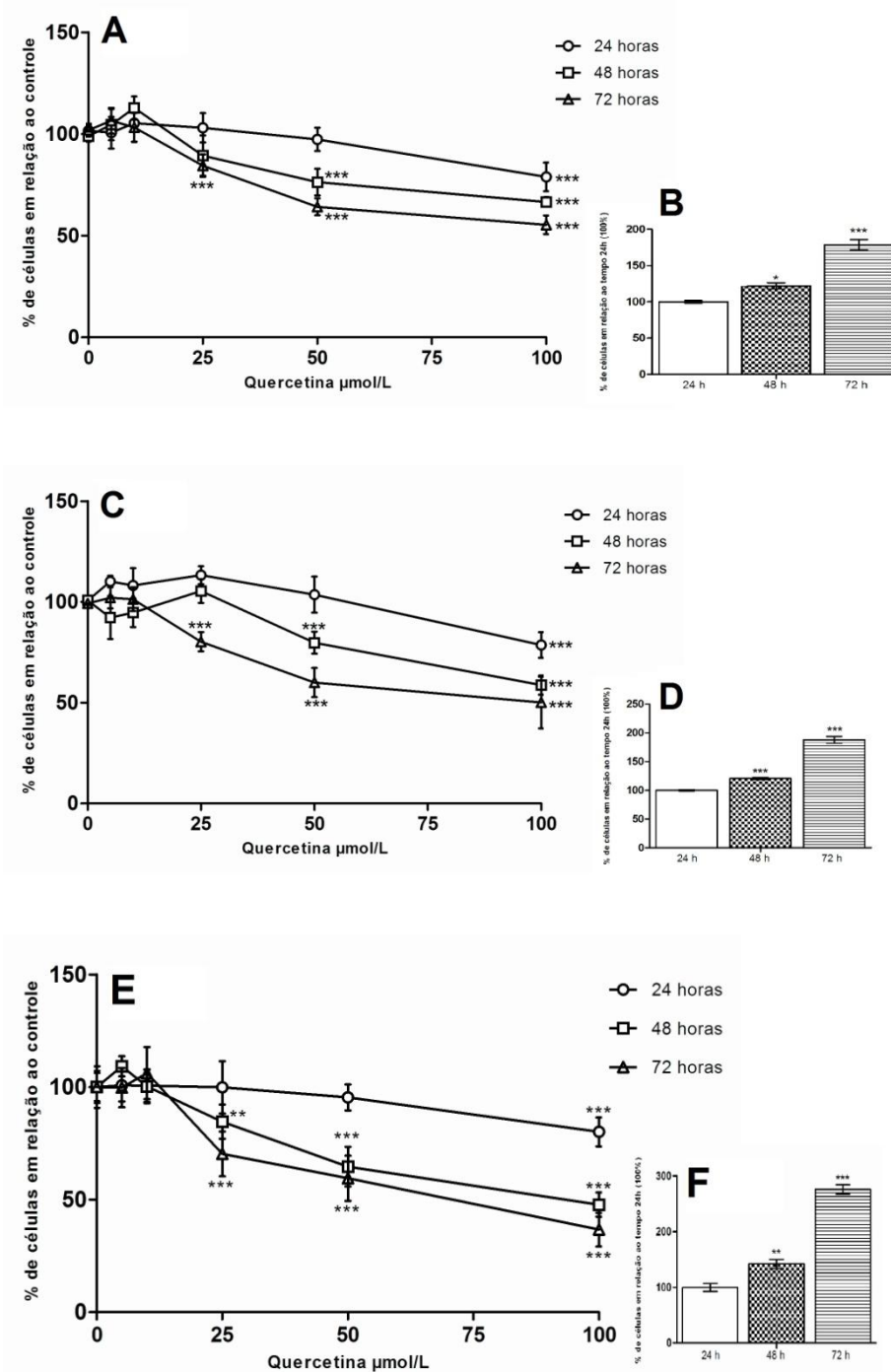


FIGURA 9: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS U373MG, U343MG e U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Curva de proliferação das células U373MG (A e B), U343MG (C e D) e U87MG (E e F) após o tratamento com 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição ao flavonóide. Em A, C e E – curva de proliferação, em B, D e F – proliferação das células na condição controle em função do tempo. Os dados mostrados são de 4 experimentos independentes feitos em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (100%) após cada tempo de tratamento com o flavonóide. ANOVA seguido de teste Tukey \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ .



TABELA 5 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TRATAMENTO COM QUERCETINA

[ ] Quercetina	U87MG			U373MG			U343MG		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>5 µmol/L</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>10 µmol/L</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>25 µmol/L</b>	ns	15%	30%	ns	ns	16%	ns	ns	20%
<b>50 µmol/L</b>	ns	35%	50%	ns	24%	36%	ns	20%	40%
<b>100 µmol/L</b>	20%	52%	63%	21%	33%	45%	21%	41%	50%

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Valores em porcentagem da redução na proliferação das três diferentes linhagens de glioma humano após o tratamento com quercetina nas concentrações e tempos mostrados. Dados de redução foram calculados quando comparados com a respectiva condição controle (adição de veículo - DMSO), ns - diferença estatística não significativa, valores numéricos com diferença significativa. ANOVA seguido de teste Tukey  $p < 0.05$ .

Depois da análise dos dados de viabilidade obtidos para as diferentes linhagens celulares, decidiu-se prosseguir os seguintes experimentos utilizando o tratamento com quercetina nas doses de 25 e 50 µmol/L por 48 horas de exposição. Esta escolha se baseou no fato que, primeiramente são doses consideradas baixas, que não causam uma grande citotoxicidade e, segundo, através da análise de dados na literatura indicando que após consumo de alimentos ricos em quercetina sua concentração plasmática pode ser atingida em uma faixa de 1 a 40 µmol/L (EGERT et al., 2008; MANACH et al., 2007). Assim, utilizando dessas doses de quercetina este trabalho pode contribuir para o melhor esclarecimento dos efeitos quimiopreventivos deste flavonóide. Também nesta etapa do trabalho, foi decidido selecionar as linhagens para os próximos ensaios. Foram escolhidas as linhagens U87MG, por ser um GBM grau IV altamente invasivo e a U373MG, por representar um astrocitoma grau III. Como a linhagem U343MG apresentou um perfil de responsividade à quercetina neste ensaio de viabilidade bem próxima à da linhagem U373MG, esta não foi incluída nos próximos experimentos.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Um parâmetro importante ao analisar a ação de um determinado fármaco que

possui atividade antitumoral é a avaliação da possível modulação pelo fármaco da progressão das células pelo ciclo celular. Este ensaio permite (juntamente com outros dados), avaliar parada de proliferação em uma determinada fase do ciclo celular, fragmentação de DNA (indício de apoptose), efeito citotóxico ou citostático do fármaco, entre outras aplicações. A técnica baseia-se na capacidade do intercalante de DNA, o Iodeto de propídeo (PI), emitir uma fluorescência que pode ser quantificada quando selecionado o detector FL2 no aparelho de citometria de fluxo (FACS); desta forma, quanto maior a quantidade de DNA na amostra em questão, maior a fluorescência medida. Selecionado o gráfico de histograma (fluorescência por eventos) é possível separar as diferentes fases do ciclo por meio de picos característicos (DARZYNKIEWICZ et al. 1992).

#### 6.2.1 Análise do ciclo celular – U373MG

As células U373MG foram tratadas com quercetina nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  pelo período de 48 horas, como descrito em materiais e métodos (item 5.4.1). Após este tempo, as células foram coletadas e analisadas por FACS. Os histogramas podem ser visualizados na figura 10.

Os histogramas podem ser delimitados por áreas dos picos (FIGURA 10, representadas pelas regiões M1, M2 e M3). A intensidade de fluorescência captada pela região M1 corresponde quantidade de células que estão na fase sub-G1 do ciclo celular, sendo a mesma caracterizada pela quantidade de DNA fragmentado. A região M2 é referente às células que estão na fase G1 do ciclo. Por fim, a região M3 corresponde às células que estão na fase G2-M do ciclo celular.

Os resultados obtidos estão representados na figura 11, e indicam que após o tratamento com quercetina as células U373MG sofrem alteração significativa da progressão do ciclo celular. Analisando as condições controle deste experimento, células sem qualquer tratamento em comparação com células que foram tratadas apenas com o veículo da droga (DMSO), podemos notar que não ocorre diferença entre os dois perfis analisados (FIGURAS 10A e 10B), revelando que o veículo (DMSO) utilizado para diluição do flavonóide não exerce nenhuma ação sobre a

progressão nas fases do ciclo na linhagem U373MG.

Quando as células de glioma U373MG são tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas, há um aumento da porcentagem de células na fase G2-M (Controle: 39%; 25  $\mu\text{mol/L}$ : 58,7%) e uma diminuição na fase G1 do ciclo celular (FIGURAS 10 C e 11). Este resultado é acompanhado pela diminuição da porcentagem de células na fase G1. A porcentagem de células que estão em G1 na condição controle é de 60,7% e após o tratamento com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina a porcentagem de células em G1 diminui significativamente, atingindo 38,59%.

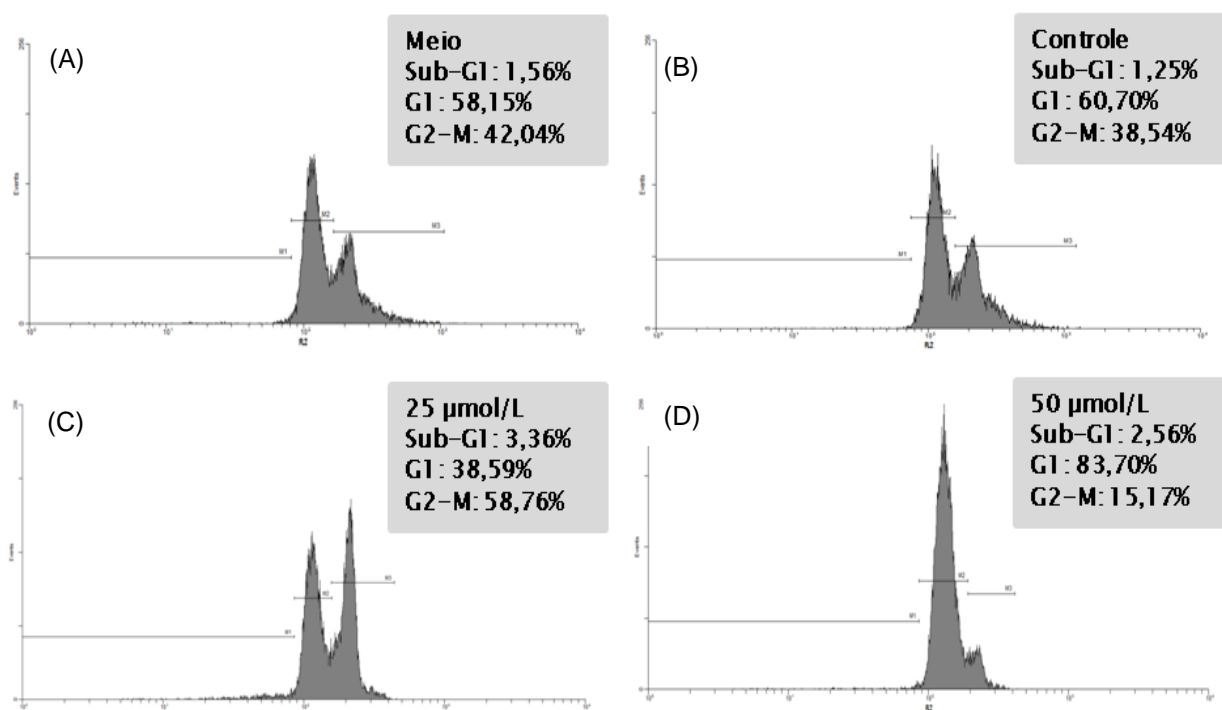


FIGURA 10: ANÁLISE DE CICLO CELULAR U373MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Histogramas representativos das células U373MG tratadas com o flavonóide quercetina por 48 horas. (A) Condição controle, células cultivadas sem nenhum tratamento (somente meio de cultura); (B) Condição controle – adição de veículo (DMSO); (C) Células tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina e (D) Células tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina. As regiões delimitadas M1, M2 e M3 nas figuras correspondem a: M1 – fase Sub-G1; M2 – fase G1 e, M3 – fase G2-M.

Já no tratamento das células U373MG com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, observamos um perfil diferente, ocorre um aumento expressivo de células na fase G1 do ciclo celular, e uma acentuada queda na quantidade de células de glioma em G2-M (FIGURAS 10 D e 11). Em relação ao controle podemos notar que o

tratamento com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina aumentou significativamente a quantidade de células na fase G1 em 38% ( $p < 0,001$ ), a quantidade de células passou de 60,7% (controle) para 83,70% (50  $\mu\text{mol/L}$ ). A diminuição da porcentagem de células em G2-M foi de 38,5% (controle) para 15,1% (na condição de tratamento - 50  $\mu\text{mol/L}$ ). Vale ressaltar que as células U373MG tiveram uma diminuição da proliferação celular na curva de sobrevivência (FIGURA 9 A) justamente na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina.

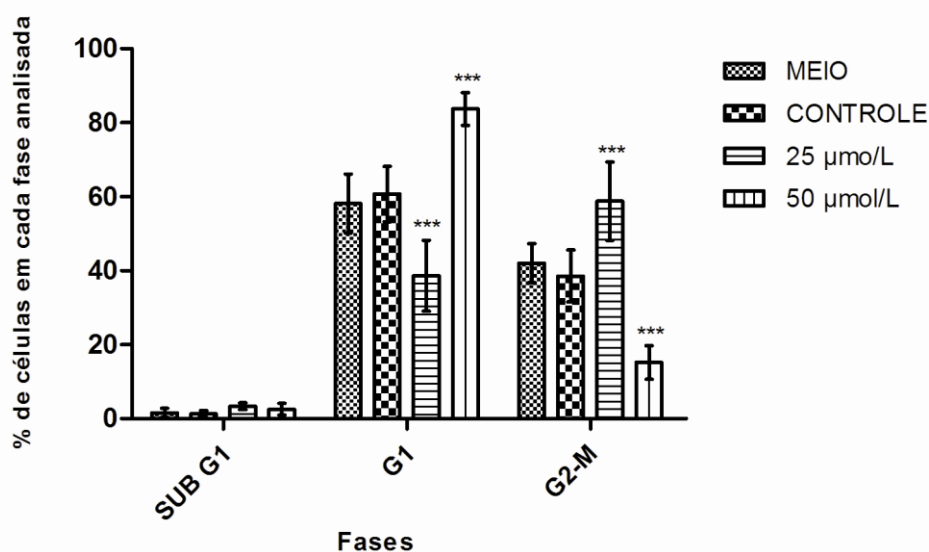


FIGURA 11: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U373MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Porcentagens de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com quercetina. Gráfico representativo de três experimentos independentes feitos em triplicatas. ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.2.2 Análise do ciclo celular – U87MG

As células U87MG – GBM grau IV- foram tratadas com quercetina nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  pelo período de 48 horas, como descrito em materiais e métodos (item 5.4.1). Após este tempo, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas podem ser visualizados na figura 12.

Os resultados obtidos indicam que após o tratamento com quercetina as células U87MG sofrem alteração na progressão do ciclo celular. Também é possível observar que as células U87MG que foram mantidas nas condições controle

(somente meio de cultura e tratada com o veículo da droga – DMSO) não alteram o perfil de progressão no ciclo celular (FIGURAS 12 A e 12 B).

O tratamento das células U87MG com quercetina provoca um aumento significativo na quantidade de células na fase G1 do ciclo (em relação ao controle) (FIGURAS 12 C e 12 D). A quantidade de células em G1 na condição controle foi de 58,3%, já com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina este valor passa para 72,3%; com o aumento da dose para 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina o aumento em G1 continua em 73,6%. Tanto na dose de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina o aumento em G1 observado é compensado com a diminuição significativa da quantidade de células na fase G2-M; a quantidade de células em G2-M na condição controle é de 40,9%, após o tratamento com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina esta porcentagem de células passa para 26,5% e 25,6% respectivamente (FIGURA 13).

É importante citar que para esta linhagem, ambas as doses de quercetina utilizadas nos tratamentos promoveram diminuição significativa na proliferação celular observadas na curva de sobrevivência (FIGURA 9 E).

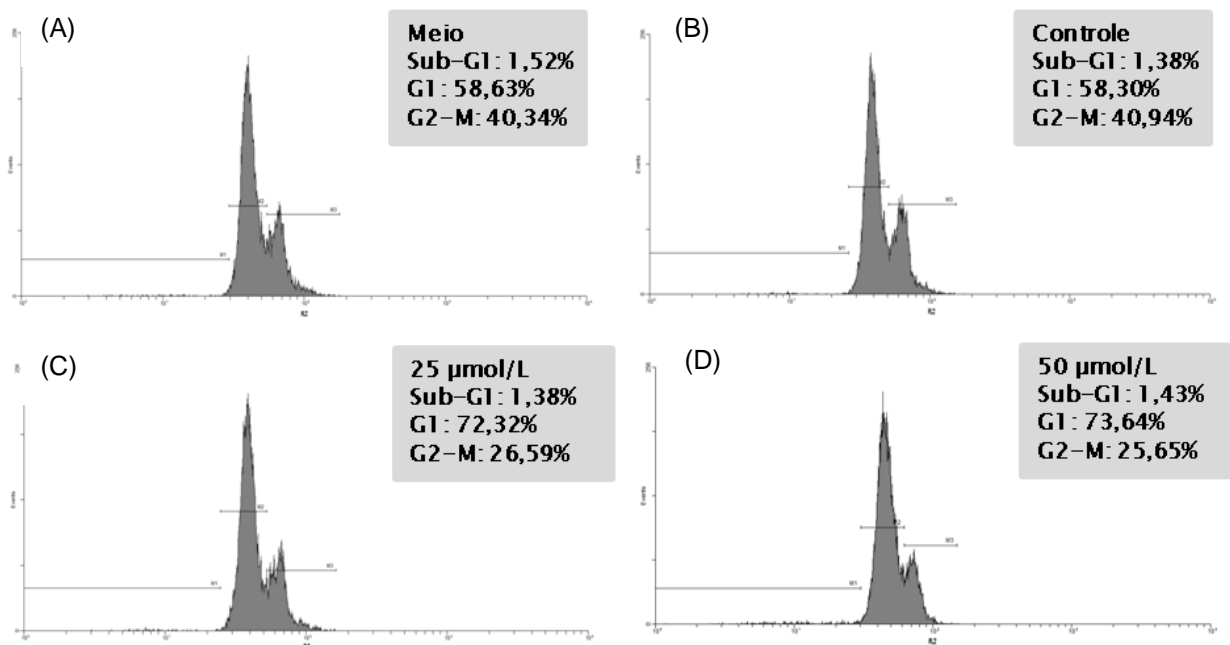


FIGURA 12: ANÁLISE DE CICLO CELULAR U87MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Histogramas representativos das células U373MG tratadas com o flavonóide quercetina por 48 horas. (A) Condição controle, células cultivadas sem nenhum tratamento (somente meio de cultura); (B) Condição controle – adição de veículo (DMSO); (C) Células tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina e (D) Células tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina. As regiões delimitadas M1, M2 e M3 nas figuras correspondem a: M1 – fase Sub-G1; M2 – fase G1e, M3 – fase G2-M.

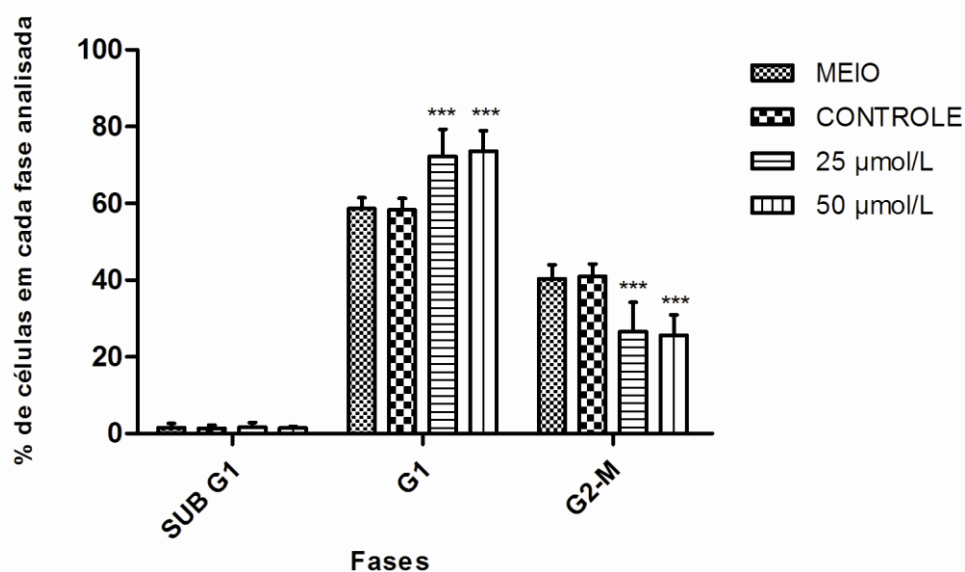


FIGURA 13: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Porcentagens de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com quercetina. Gráfico representativo de três experimentos independentes feitos em triplicatas. ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.2.3 Comparação da análise de ciclo celular – U373MG e U87MG

Seguiu-se a análise comparativa das alterações nas fases do ciclo celular mediadas por quercetina nas duas linhagens de glioma humano. O tratamento das células U373MG com concentração de 25 µmol/L de quercetina promoveu um aumento da porcentagem de células em G2-M, fato que não ocorreu na linhagem U87MG. Nesta linhagem, o tratamento com quercetina na mesma dose (25 µmol/L) levou a um aumento na quantidade de células na fase G1 do ciclo celular. Porém quando a dose de quercetina é aumentada para 50 µmol/L ocorre um aumento da porcentagem de células na fase G1 em ambas as linhagens analisadas. Os resultados estão esquematicamente resumidos na tabela 6.

Pode-se sugerir que o aumento da porcentagem de células em G2 na célula U373MG após tratamento com a menor dose de quercetina analisada talvez seja uma adaptação celular, visto que a dose de 25 µmol/L não foi estatisticamente significativa em diminuir a proliferação destas células, como pode ser observado na curva de sobrevivência (FIGURA 9 A). Para a linhagem U87MG, ambas as doses de

quercetina utilizadas para os tratamentos (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) promoveram diminuição significativa da proliferação destas células (FIGURA 9 E). Diante destes resultados, podemos sugerir que a diminuição da proliferação de células de glioma humano mediada por quercetina pode ser via parada da progressão do ciclo na fase G1.

**TABELA 6 – FASES DO CICLO CELULAR QUE OCORRERAM AUMENTO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA**

	<b>U87MG</b>	<b>U373MG</b>
<b>Quercetina 25 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	G1	G2
<b>Quercetina 50 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	G1	G1

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Resumo esquemático das principais alterações (aumentos de quantidade de células) na fase do ciclo celular indicada.

Sabendo que a quercetina está inibindo a proliferação celular, causando um aumento de células na fase G1 do ciclo celular, a nossa próxima pergunta foi: o tratamento das células de glioma com quercetina está causando morte celular ? Para poder responder essa questão a próxima etapa do trabalho foi avaliar a morte celular também por citometria de fluxo.

### 6.3 ANÁLISE DA MORTE CELULAR

A morte celular é um processo comum nos tecidos vivos, tanto em condições fisiológicas como em processos patológicos. Vários compostos tem a capacidade de induzir a morte celular, e a indução seletiva da apoptose em células tumorais constitui uma das estratégias mais importantes exploradas pela quimioterapia em vários tipos de tumor.

Para avaliar a possível indução de morte celular mediada pelo tratamento com quercetina, as células de glioma foram tratadas com quercetina nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  pelo período de 48 horas, e em seguida estas foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Neste ensaio é realizada a dupla marcação das células com PI e anexina-V FITC. O PI é um intercalante de DNA e células que entram em necrose sofrem permeabilização de membrana e o corante é

capaz de penetrar nas células. A anexina-V (um anticoagulante) tem preferência por ligar-se a componentes negativos de fosfolipídios de membrana (fosfatidilserina). Durante o processo de apoptose ocorre uma disfunção da membrana celular e a fosfatidilserina que estava do lado interno da membrana é externalizada, desta forma, a anexina-V é capaz de se ligar a ela e quando conjugada com fluoresceína identifica estas células como apoptóticas (DARZYNKIEWICZ et al. 1997; BERTHO; SANTIAGO; COUTINHO, 2000).

### 6.3.1 Morte celular – U373MG

As células U373MG foram submetidas aos procedimentos descritos em materiais e métodos (item 5.5.1) e analisadas usando gráficos do tipo “*dot-plot*” (FIGURA 14). As células representadas no quadrante A foram consideradas viáveis, B – necróticas, e C e D – apoptóticas.

As condições experimentais neste ensaio foram: controle (células tratada com o veículo-DMSO); células tratadas com diferentes concentrações de quercetina: 25, 50 e 200  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas; células tratadas com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 500  $\mu\text{mol/L}$  por 3 horas (controle positivo para necrose -BARAN et al. 2010 adaptado); células tratadas com menadiona 10  $\mu\text{mol/L}$  e arsenito de sódio 2  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas (controle positivo para apoptose -CHOWDHURY et al. 2009; ALIPRANDINI, 2010 adaptado).



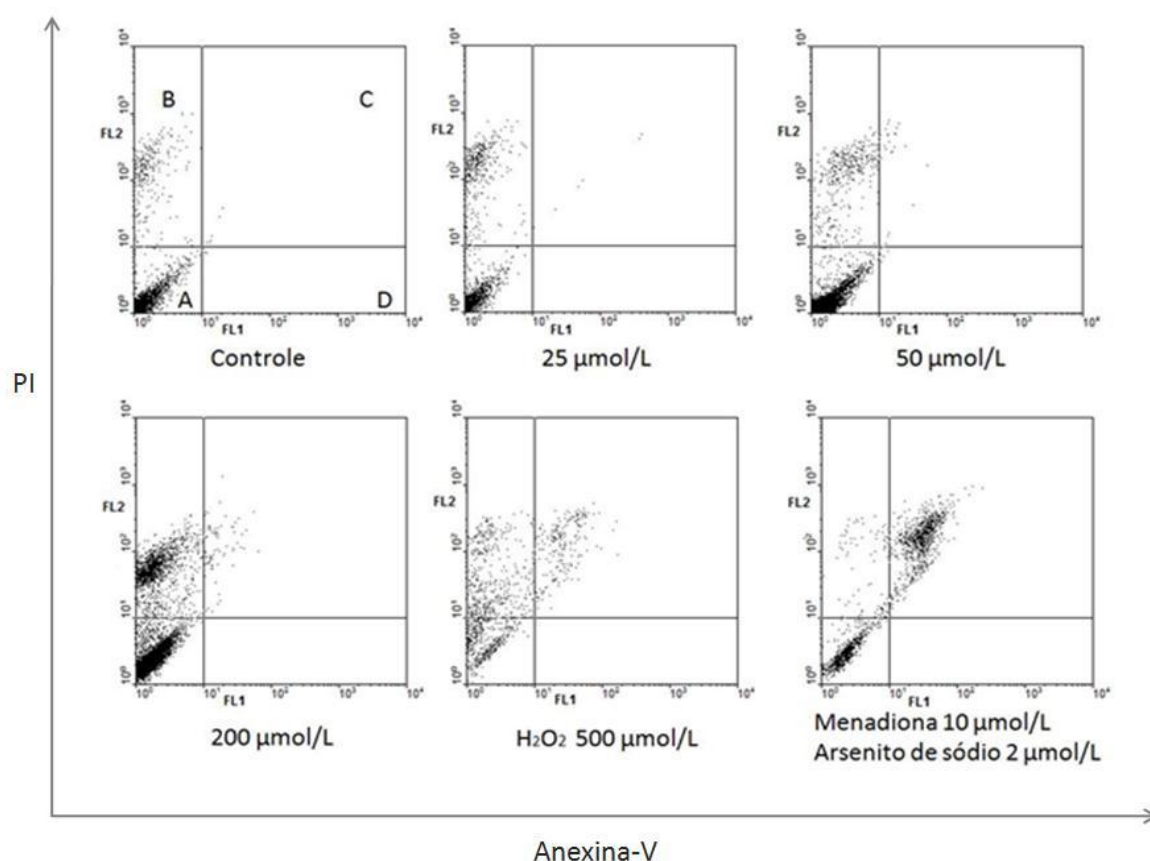


FIGURA 14: ANÁLISE DE MORTE CELULAR U373MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: “Dot-plots” representativos dos tratamentos com o flavonóide quercetina por 48 horas. Células tratadas com controle (DMSO), 25, 50 e 200 µmol/L de flavonóide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µmol/L por 3 horas, Menadiona 10 µmol/L- arsenito de sódio 2 µmol/L por 48 horas. Os quadrantes delimitados A, B, C e D no controle correspondem também às outras condições de tratamento e são denominadas células viáveis (A), necróticas (B) e apoptóticas (C e D).

Os resultados de FACS (FIGURAS 14 e 15) indicaram que o tratamento das células U373MG com as concentrações de 25 e 50 µmol/L de quercetina não foram capazes de induzir morte por apoptose ou necrose nas células U373MG quando comparados com seu controle; já a concentração de 200 µmol/L de quercetina promoveu um aumento da quantidade de células U373MG em necrose ( $p < 0,001$ ). Os gráficos mostrados na figura 16 indicam o percentual de células viáveis, necróticas e apoptóticas nos experimentos para as diferentes condições do ensaio.

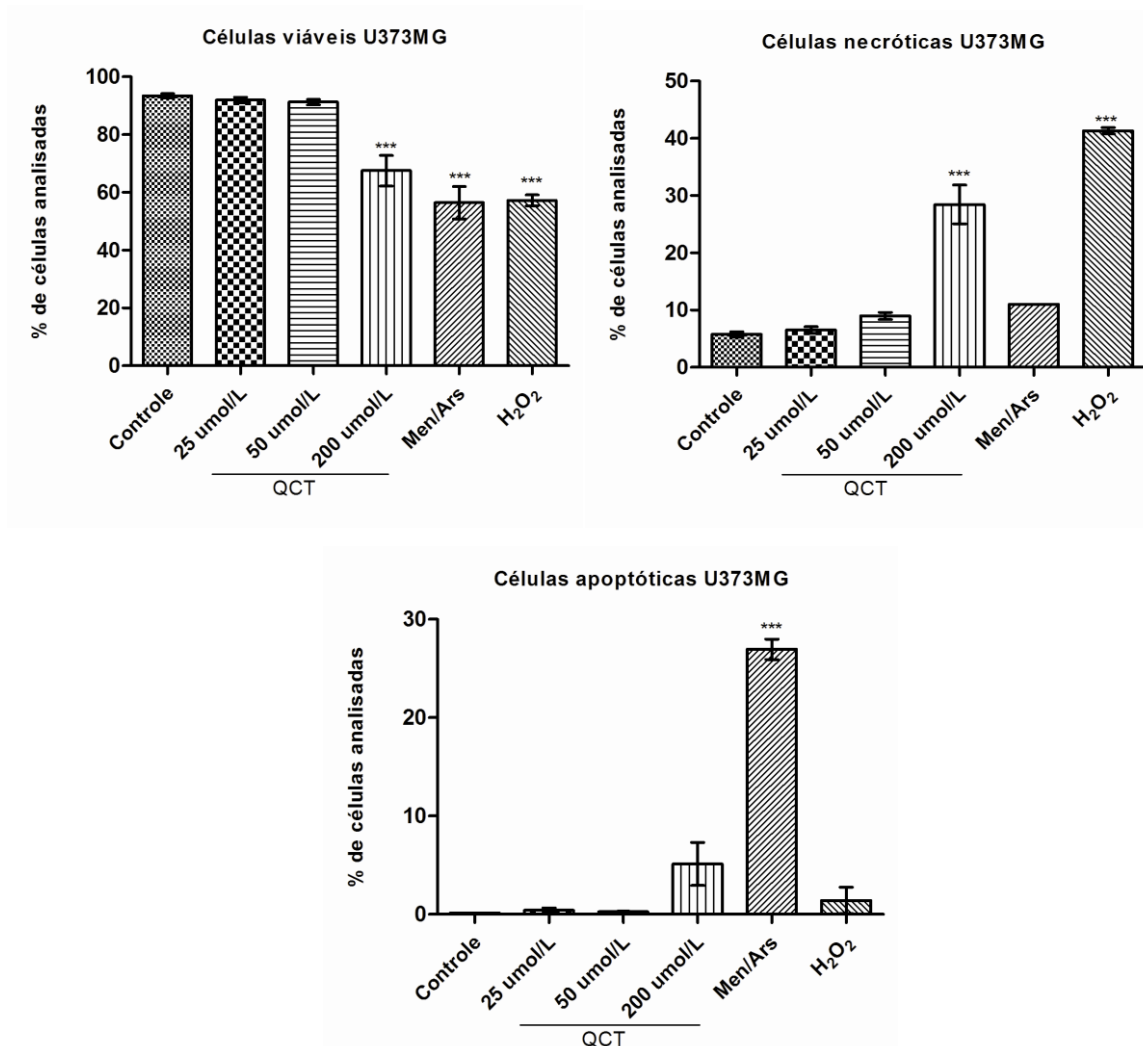


FIGURA 15: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U373MG EM CADA QUADRANTE ANALISADO APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Porcentagens de células em cada quadrante dos gráficos analisados após o tratamento com quercetina. Gráfico representativo de cinco experimentos independentes feitos em duplicatas. Valores de significância estatística quando comparado com o controle em cada quadrante. ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ . Men/Ars = menadiona 10  $\mu\text{mol/L}$  e arsenito de sódio 2  $\mu\text{mol/L}$ .

### 6.3.2 Morte celular – U87MG

As células U87MG (grau IV) tiveram um perfil de marcação com anexina V e PI bem parecido com o encontrado para as células U373MG (FIGURA 16). Observou-se que o tratamento das células U87MG com quercetina não promoveu aumento da quantidade de células necróticas ou apoptóticas após os tratamentos com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, porém, as células que foram tratadas com a dose

de 200  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas tiveram um aumento de células necróticas em relação ao controle (FIGURAS 16 e 17).

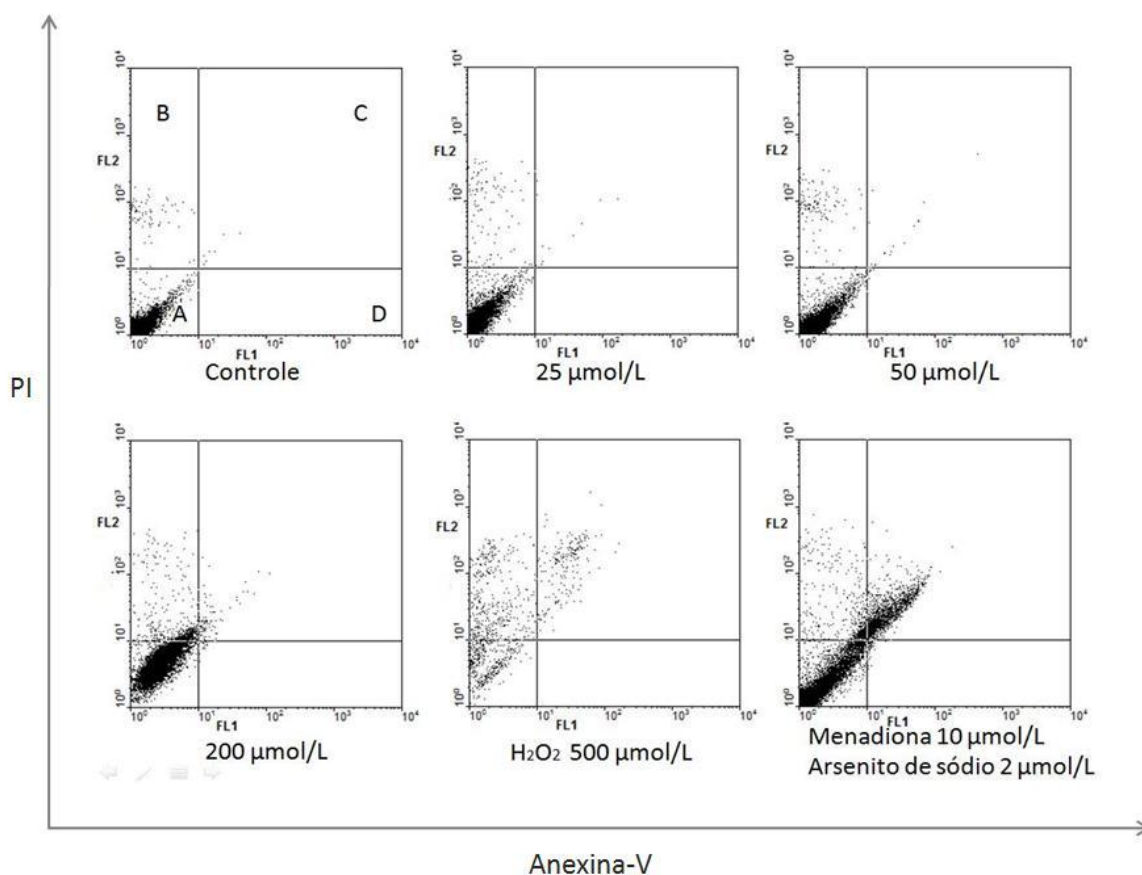


FIGURA 16: ANÁLISE DE MORTE CELULAR U87MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: “Dot-plots” representativos dos tratamentos com o flavonóide quercetina por 48 horas. Células tratadas com controle (DMSO), 25, 50 e 200  $\mu\text{mol/L}$  de flavonóide,  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{mol/L}$  por 3 horas, Menadiona 10  $\mu\text{mol/L}$ - arsenito de sódio 2  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas. Os quadrantes delimitados A, B, C e D no controle correspondem também às outras condições de tratamento e são denominadas células viáveis (A), necróticas (B) e apoptóticas (C e D).

Os gráficos mostrados na figura 18 indicam o percentual de células U87MG em cada quadrante (A – viáveis, B – necróticas, C e D – apoptóticas) após o tratamento com quercetina por 48 horas.

### 6.3.3 Comparação entre as duas linhagens

A análise conjunta dos nossos dados permite concluir que o tratamento das

células de glioma humano com o flavonóide nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  não induziu morte celular (necrose nem apoptose); somente a dose alta de 200  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina foi capaz de provocar necrose nestas células.

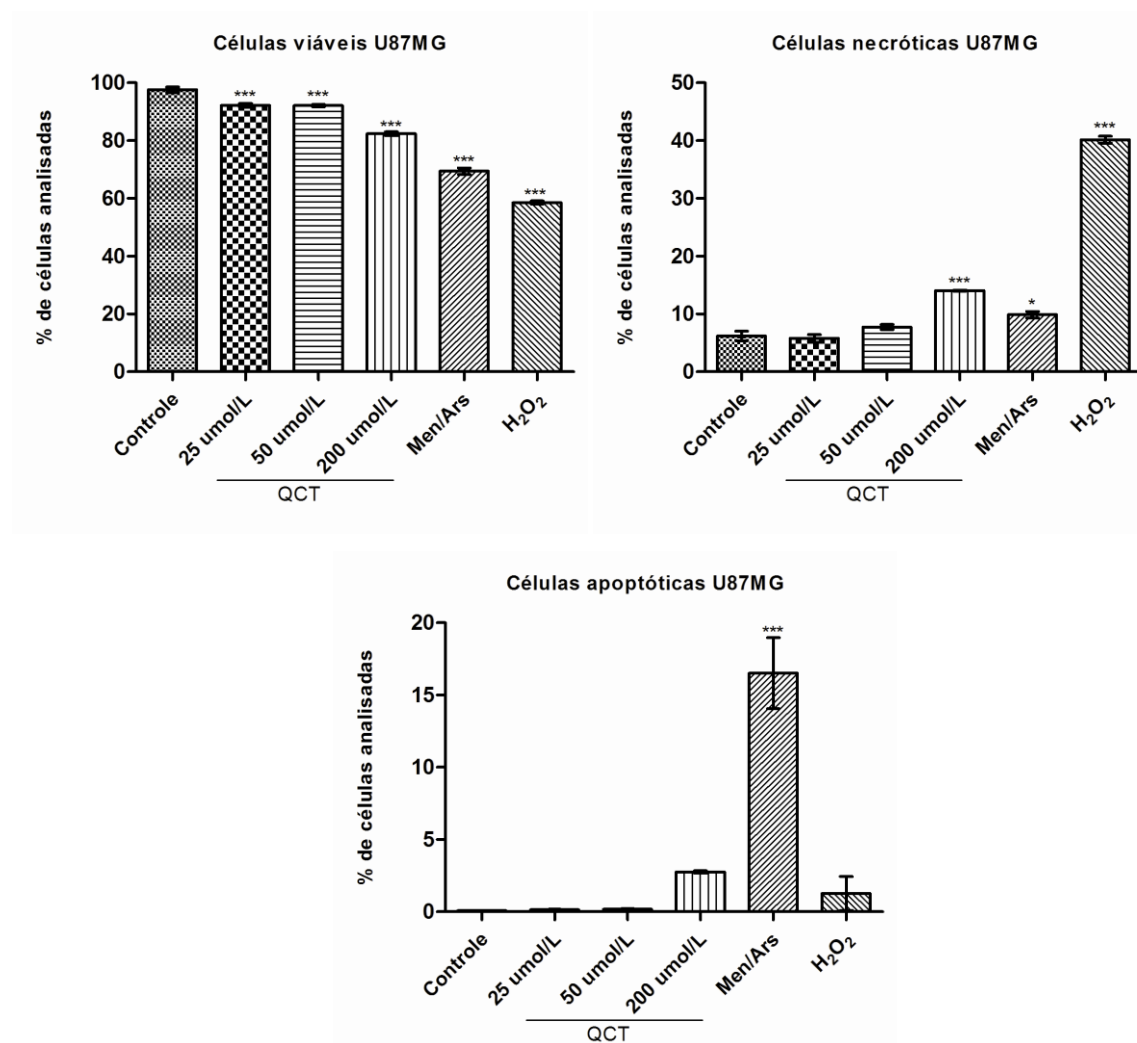


FIGURA 17: PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG EM CADA QUADRANTE ANALISADO APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Porcentagens de células em cada quadrante dos gráficos analisados após o tratamento com quercetina. Gráfico representativo de cinco experimentos independentes feitos em duplicatas. Valores de significância estatística quando comparado com o controle em cada quadrante. ANOVA \*\*\* p < 0,001, \* p < 0,05. Men/Ars = menadiona 10  $\mu\text{mol/L}$  e arsenito de sódio 2  $\mu\text{mol/L}$ .

Após a constatação que as doses de tratamento com quercetina utilizadas neste trabalho (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) não causavam morte celular, nós podemos sugerir que o efeito da quercetina (doses baixas) nas células de glioma testadas é citostático. Para avaliar essa hipótese decidiu-se avaliar o potencial de recuperação das células de glioma após o tratamento com quercetina.

#### 6.4 ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO

Para avaliar o potencial de recuperação das células de glioma após o tratamento com quercetina, as células U373MG e U87MG foram tratadas, segundo item 5.5 (MATERIAIS E MÉTODOS), com o flavonóide por 48 horas nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ . A viabilidade celular nos tempos do experimento de 48h (etapa de exposição das células ao flavonóide) e 96h (etapa de possível recuperação das células) foi avaliada por coloração com cristal violeta.

Os resultados estão mostrados na Figura 18 A, e evidenciam que ambas as células de glioma (U87MG e U373MG) que estavam sob o estímulo de parada de proliferação no tempo de 48h após a exposição ao flavonóide voltaram a proliferar em intensidade equivalente que as células da condição controle (células tratadas por 48h apenas com o veículo da droga - DMSO). Foi realizada ainda uma relação entre as medidas de absorbância nos tempos de 96 horas e 48 horas do experimento. Os resultados estão indicados na Figura 18 B e indicam que não houve diferença estatística nas razões  $\text{Abs}_{96\text{h}}/\text{Abs}_{48\text{h}}$  entre as condições experimentais: células de glioma tratadas com DMSO, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina. Estes resultados, em conjunto com os ensaios prévios de viabilidade, curva dose-resposta e ensaios de citometria de fluxo, corroboram nossa hipótese de que o tratamento das células de glioma humano com quercetina promove parada de proliferação, levando a um aumento significativo do número de células na fase G1 do ciclo celular.

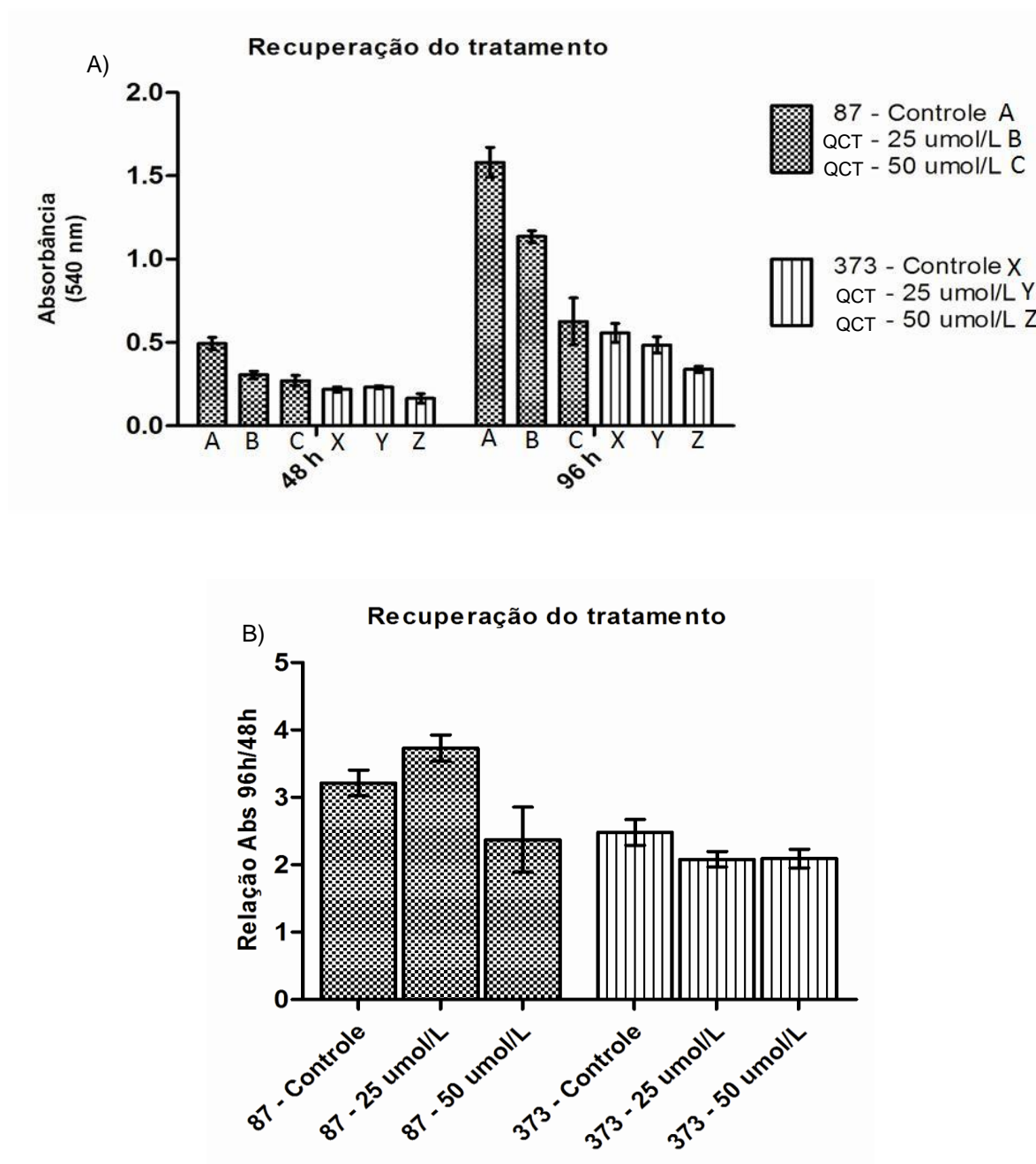


FIGURA 18: ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DAS CÉLULAS U87MG E 373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Em (A) estão indicadas as leituras de absorbância obtidas para as condições de tratamento das células de glioma mantidas por 48 e 96 horas, sendo que em 48 horas as células são mantidas na presença do flavonóide e o ponto de 96 horas – é indicativo da somatória entre as 48 horas de tratamento com o agente + 48 horas adicionais de cultivo em meio sem tratamento. Em (B) estão plotadas as razões entre as absorbâncias obtidas nos tempos 96 / 48 horas, não havendo nenhuma diferença significativa entre os grupos. Dados de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. ANOVA \*  $p < 0,05$ . QCT: quercetina.

## 6.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

### 6.5.1 Ensaio de *Scratch in vitro* – U373MG

Uma das características importantes de células tumorais é a elevada capacidade migratória. Um experimento bastante simples de avaliar a migração celular é o ensaio de *Scratch in vitro* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Este ensaio é aplicável para cultura celulares aderentes. Após o crescimento celular em alta confluência, é feito um “risco” com o auxílio de uma ponteira p200 de modo a retirar uma camada de células em uma determinada região da placa (região do “risco”), sendo posteriormente realizado o acompanhamento da migração das células adjacentes em direção ao espaço livre na placa.

As células U373MG foram submetidas ao ensaio de *Scratch* e tratadas com quercetina nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 24 (FIGURAS 19C e 19D) e 48 horas (FIGURAS 19G e 19H). As micrografias estão apresentadas a seguir.

A análise deste experimento indicou que o tratamento com quercetina inibiu a migração das células U373MG tanto em 24 como em 48 horas de exposição à droga. As duas concentrações de quercetina utilizadas no estudo (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) foram capazes de inibir a migração celular, indicando que estas células sofrem além do efeito de parada de proliferação, também um efeito inibitório de migração após o tratamento com quercetina. Cada micrografia foi analisada no *software* Photoshop e a distância medida em u.a. entre as duas regiões flangeadoras do risco foram medidas e plotadas em um gráfico para a análise estatística. Os dados estão representados na figura 20.



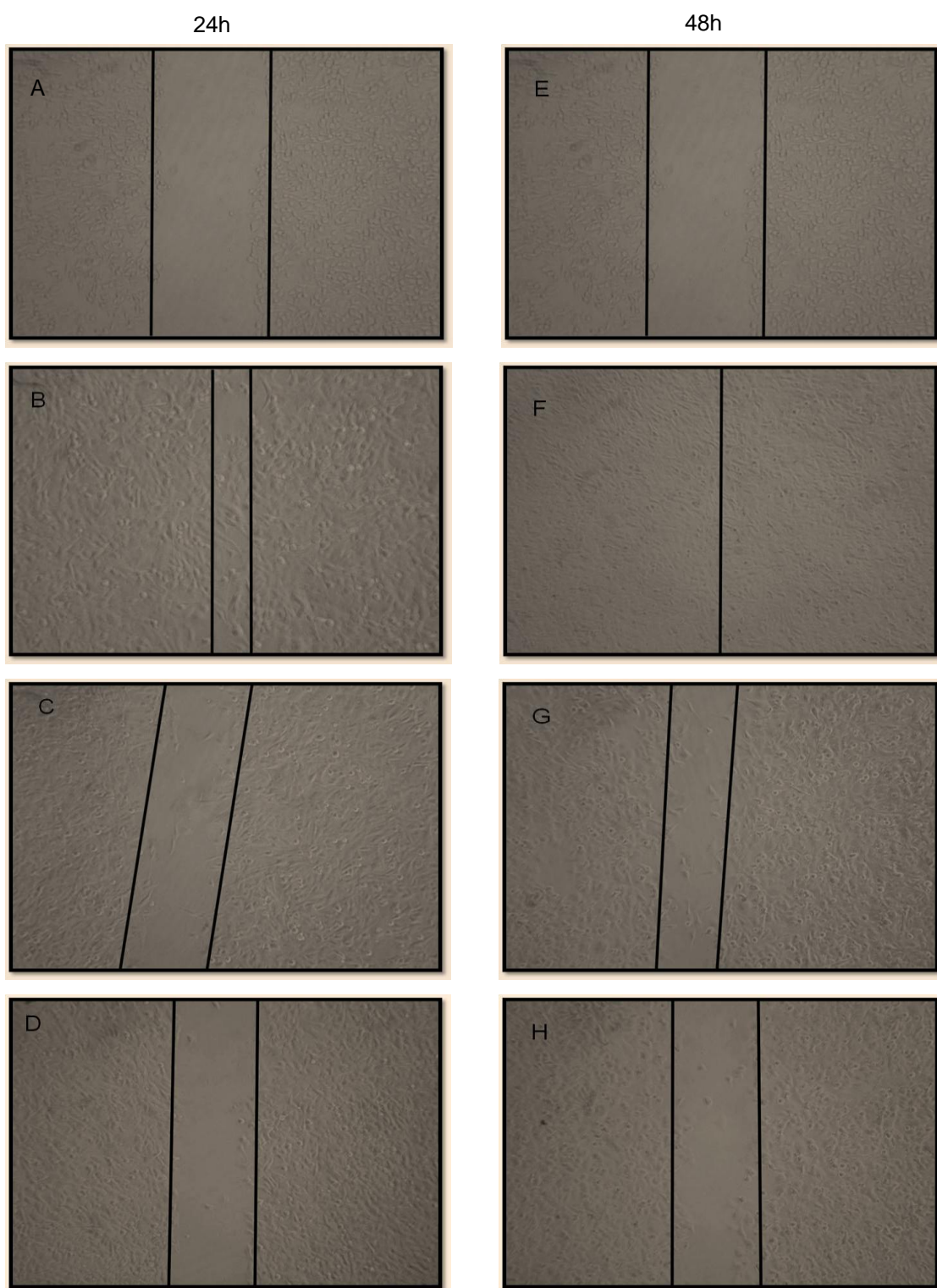


FIGURA 19: ENSAIO DE *SCRATCH* DA LINHAGEM U373MG

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Ensaio de *Scratch* das células U373MG. Os painéis A e E representam as células logo após o risco, ou tempo de 0 hora; em B condição controle após 24 horas de tratamento; em C e D células tratadas com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 24 horas (respectivamente). F - representação da condição controle após 48 horas; em G e H células tratadas com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas (respectivamente). Micrografias representativas de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. Aumento de 400x.



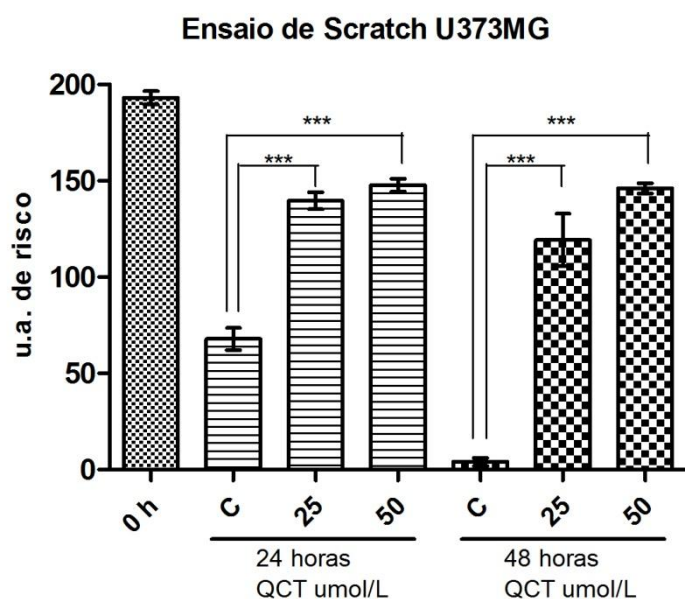


FIGURA 20: GRÁFICO RELATIVO AO ENSAIO DE *SCRATCH* DA LINHAGEM U373MG

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As distâncias entre as regiões flanqueadoras do risco foram medidas após o tempo de 24 e 48 horas de tratamento com quercetina. Resultados correspondem a dois experimentos feitos em triplicatas. ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ . QCT: quercetina.

O “risco” tem uma distância média de 200 u.a. nas imagens obtidas. Na condição controle após 24 horas as células conseguem migrar diminuindo esta distância para 67,8 u.a. e posteriormente após 48 horas, a distância atinge 0 a 4 u.a. Quando tratamos essas células com quercetina em 24 e 48 horas, as distâncias entre as regiões flanqueadoras do “risco” permanecem maiores em relação ao observado na condição controle: em 24 horas/25  $\mu\text{mol/L}$  – 139,6 u.a.; em 24 horas/50  $\mu\text{mol/L}$  – 147,7 u.a.; em 48 horas/25  $\mu\text{mol/L}$  – 119,3 u.a.; e em 48 horas/50  $\mu\text{mol/L}$  – 146,0 u.a., indicando uma diminuição significativa do potencial migratório das células U373MG após o tratamento com quercetina.

### 6.5.1 Ensaio de *Scratch in vitro* – U87MG

O ensaio de *Scratch* das células U87MG também indicou uma inibição da migração celular mediado pela quercetina (FIGURA 21). A inibição ocorreu em ambos os tempos analisados do ensaio (24 e 48 horas). Porém, verificamos que

somente as células U87MG que foram tratadas com a dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina tiveram a migração celular inibida em ambos os tempos de tratamento. O tratamento destas células com a dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  do flavonóide foi incapaz de inibir a migração celular no tempo de 48 horas, diferentemente do encontrado para as células U373MG.

Quando comparado com a linhagem U373MG, fica evidente que as células grau IV (U87MG) possuem uma capacidade migratória significativamente maior.

Os dados da medida das distâncias entre as duas regiões flanqueadoras do “risco” nas células U87MG nas diferentes condições do ensaio estão representados na figura 22. Na condição controle (FIGURA 21B) após 24 horas, as células conseguiram migrar diminuindo de 200 a 82,1 u.a. a distância entre as regiões flanqueadoras do “risco”, já em 48 horas (FIGURA 21F) ocorre uma migração total sobre a região. Quando as células foram tratadas com quercetina (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) em 24 horas, as distâncias entre as regiões permanecem maiores em relação ao observado na condição controle (125,0 e 184,7 u.a., respectivamente). Em 48 horas, quando as células U87MG foram tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, não houve inibição da migração celular, somente o tratamento com quercetina na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  foi capaz de inibir a migração celular, tendo uma distância entre as regiões do “risco” de 133,3 u.a., evidenciando que em 48 horas a dose mais alta testada provocou alteração significativa no potencial migratório destas células.

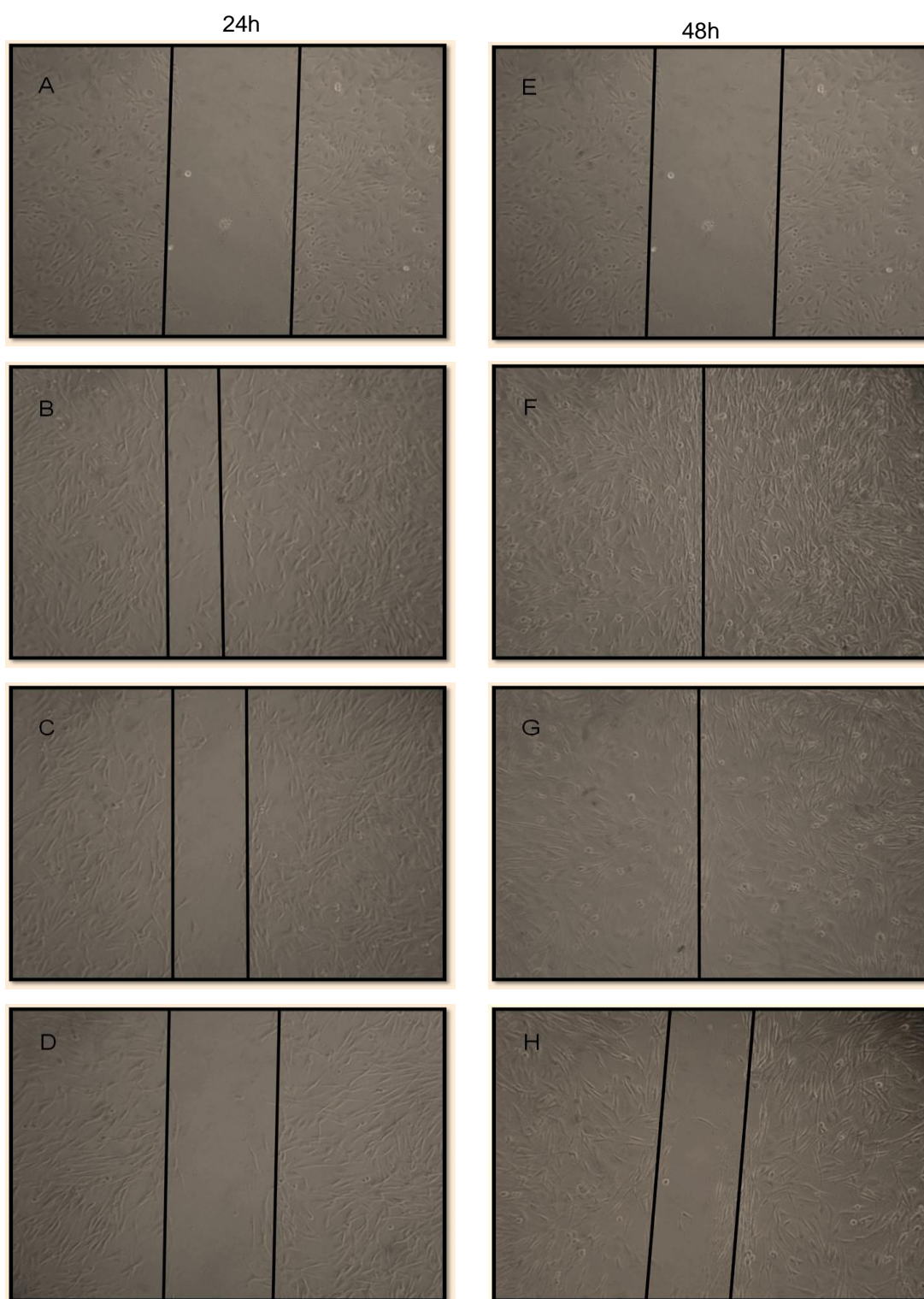


FIGURA 21: ENSAIO DE *SCRATCH* DA LINHAGEM U87MG

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Ensaio de *Scratch* das células U87MG. Os painéis A e E representam as células logo após o risco, ou tempo de 0 hora; em B condição controle após 24 horas de tratamento; em C e D células tratadas com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 24 horas (respectivamente). F - representação da condição controle após 48 horas; em G e H células tratadas com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas (respectivamente). Micrografias representativas de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. Aumento de 400x.

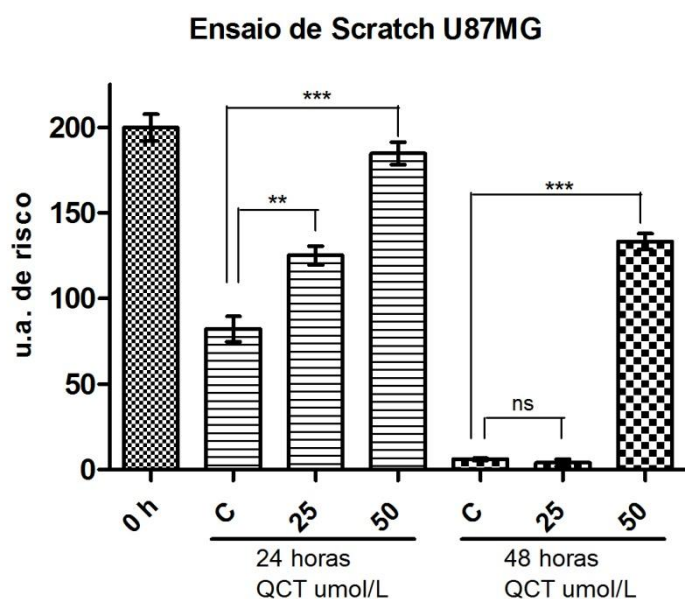


FIGURA 22: GRÁFICO RELATIVO AO ENSAIO DE SCRATCH DA LINHAGEM U87MG

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As distâncias entre as regiões flanqueadoras do risco foram medidas após o tempo de 24 e 48 horas. Resultados de dois experimentos feitos em triplicatas. ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . QCT: quercetina.

## 6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DE *RECK* (E TRANSCRITOS ALTERNATIVOS) *TIMPs* E *MMPs* APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA

### 6.6.1 Análise dos níveis de mRNA nas células U373MG

Os níveis de expressão dos transcritos canônico (*RECK A*) e alternativos (*RECK B* e *D*) do gene *RECK* foram avaliados por RT-qPCR (conforme descrito no item 5.7.1 na seção “Materiais e Métodos”) após o tratamento das células U373MG com quercetina pelo período de 48 horas. A condição controle se refere ao tratamento das células com o veículo diluente do flavonóide (DMSO). A figura 23 mostra um gel representativo da integridade do RNA total extraído dessas células, que posteriormente foram usados para a síntese do DNA complementar.

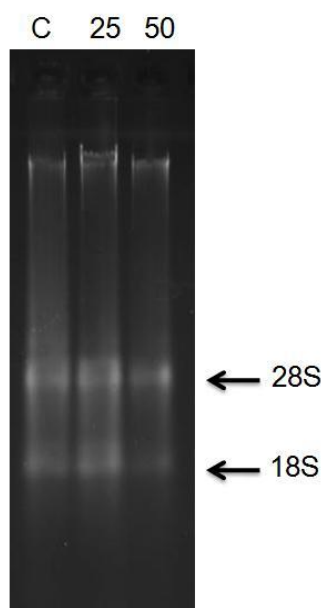


FIGURA 23: RNA TOTAL EXTRAÍDO DA LINHAGEM U373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagem representativa de eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%. Legenda: C = controle, 25 = 25  $\mu\text{mol/L}$ , 50 = 50  $\mu\text{mol/L}$ .

Os resultados obtidos do experimento de RT-qPCR estão mostrados no painel de expressão da figura 24. Os genes de interesse foram normalizados (usando o *software* geNorm) pela expressão constitutiva de três diferentes genes de controle interno: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*hGAPDH*), gene constitutivamente ativo da via glicolítica; hipoxantina fosforribosiltransferase (*hHPRT*), relacionado com o metabolismo de purinas e; hidroximetilbilano sintase (*hHMBS*), gene envolvido no metabolismo do grupamento HEME.

Os resultados obtidos indicam que o tratamento das células U373MG com quercetina, nas doses e tempo avaliados, não modulam a expressão do transcrito canônico de *RECK*, enquanto que os transcritos alternativos RECK B e RECK D apresentam uma diminuição significativa nos níveis de mRNA após o tratamento com quercetina.

Em relação às MMPs, foi observado que após o tratamento com quercetina, os níveis de mRNA de *MMP 2* diminuem significativamente, já em relação aos níveis de transcrito de *MMP 9* e *MT1-MMP* não ocorreu modulação dos mesmos nas células U373MG frente ao tratamento com quercetina.

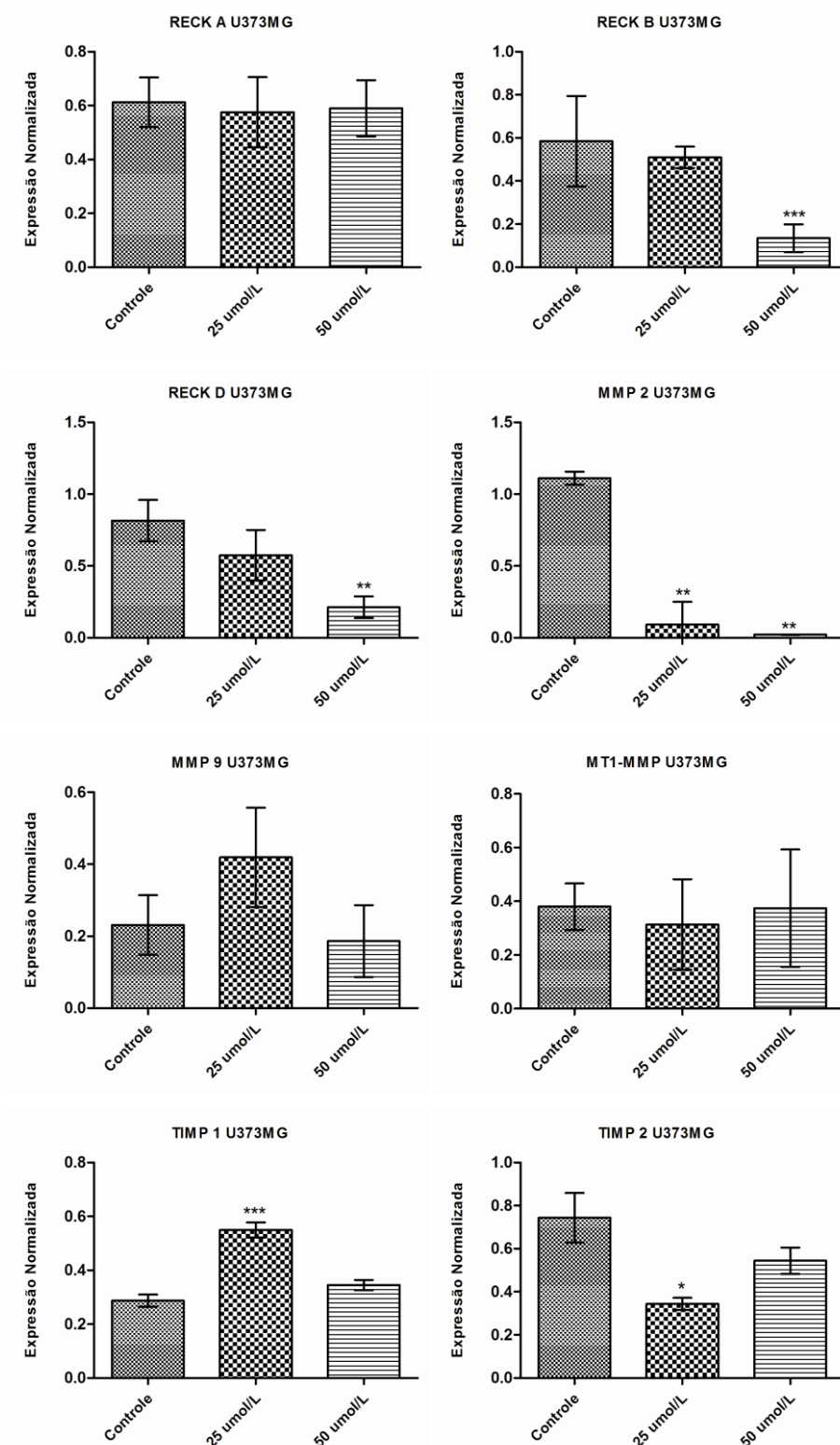


FIGURA 24: PAINEL DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM U373MG FRENTE AO TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Expressão relativa dos genes *RECK* canônico (*RECK A*) e transcritos alternativos (*RECK B* e *D*), *MMP 2*, *MMP 9*, *MT1-MMP*, *TIMP 1* e *2* nas células U373MG após o tratamento com quercetina por 48 horas. As condições controles são referentes às células tratadas com DMSO. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (*hGAPDH*, *hHPRT* e *hHMBS*). ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

As expressões dos inibidores teciduais de MMPs – TIMPs, também foram analisados neste estudo frente ao tratamento das células U373MG com quercetina. Foi verificado que os níveis de mRNA de *TIMP 1* aumentaram significativamente nas células U373MG após o tratamento com quercetina na dose de 25 µmol/L, porém esse aumento não foi mantido na dose de 50 µmol/L de quercetina. Para *TIMP 2* verificou-se que os níveis desse transcrito foram diminuídos após tratamento das células U373MG com a dose de 25 µmol/L de quercetina e na dose de 50 µmol/L não se observou modulação.

Em conjunto, os resultados indicam que a quercetina provoca diminuição significativa nos níveis de transcrito de *RECK B* e *RECK D*; aumento de *TIMP 1* e diminuição de *TIMP 2* e *MMP 2* nas células U373MG.

#### 6.6.2 Análise dos níveis de mRNA – U87MG

As células U87MG foram submetidas a análise da modulação dos níveis de mRNA frente ao tratamento com quercetina da mesma maneira como descrito para a linhagem U373MG. A figura 25 mostra um gel representativo da integridade do RNA total extraído nas diferentes condições experimentais, que posteriormente foi utilizado para a síntese de cDNA.

Os resultados obtidos no ensaio de RT-qPCR estão mostrados no painel na figura 26.



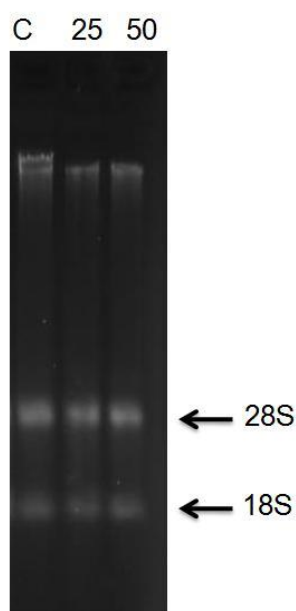


FIGURA 25: RNA TOTAL EXTRAÍDO DA LINHAGEM U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Imagem representativa de eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%. Legenda: C = controle, 25 = 25  $\mu\text{mol/L}$ , 50 = 50  $\mu\text{mol/L}$ .

Os resultados de RT-qPCR para a linhagem U87MG, indicaram que os níveis de mRNA de RECK A não foram modulados nas células U87MG após o tratamento com o flavonóide quercetina nas condições testadas. Nos quatro experimentos independentes não houve detecção dos transcritos alternativos *RECK B* e *RECK D*, tanto na condição controle quanto nas condições tratadas com quercetina. Resultados de Lima et al. (dados não publicados) revelaram que a linhagem U87MG possui níveis bem baixos dos transcritos *RECK B* e *RECK D* quando comparados com outras linhagens tumorais, podendo ser devido a essa característica que nós não conseguimos detectar a amplificação destes transcritos nos nossos ensaios.

O tratamento com quercetina nas células U87MG foi capaz de modular positivamente os níveis dos inibidores teciduais de MMPs. Para *TIMP 1* o tratamento das células U87MG com a dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina foi capaz de aumentar significativamente os níveis desse transcrito, cuja expressão relativa era de 0,0027 na condição controle, sendo aumentada para 0,7004 na condição tratada com quercetina. A análise dos níveis de transcrito de *TIMP 2* mostraram que o tratamento dessas células com a dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina modulou negativamente a sua expressão, porém com o aumento da dose de quercetina (tratamento com 50



$\mu\text{mol/L}$ ) ocorreu um aumento significativo na sua expressão.

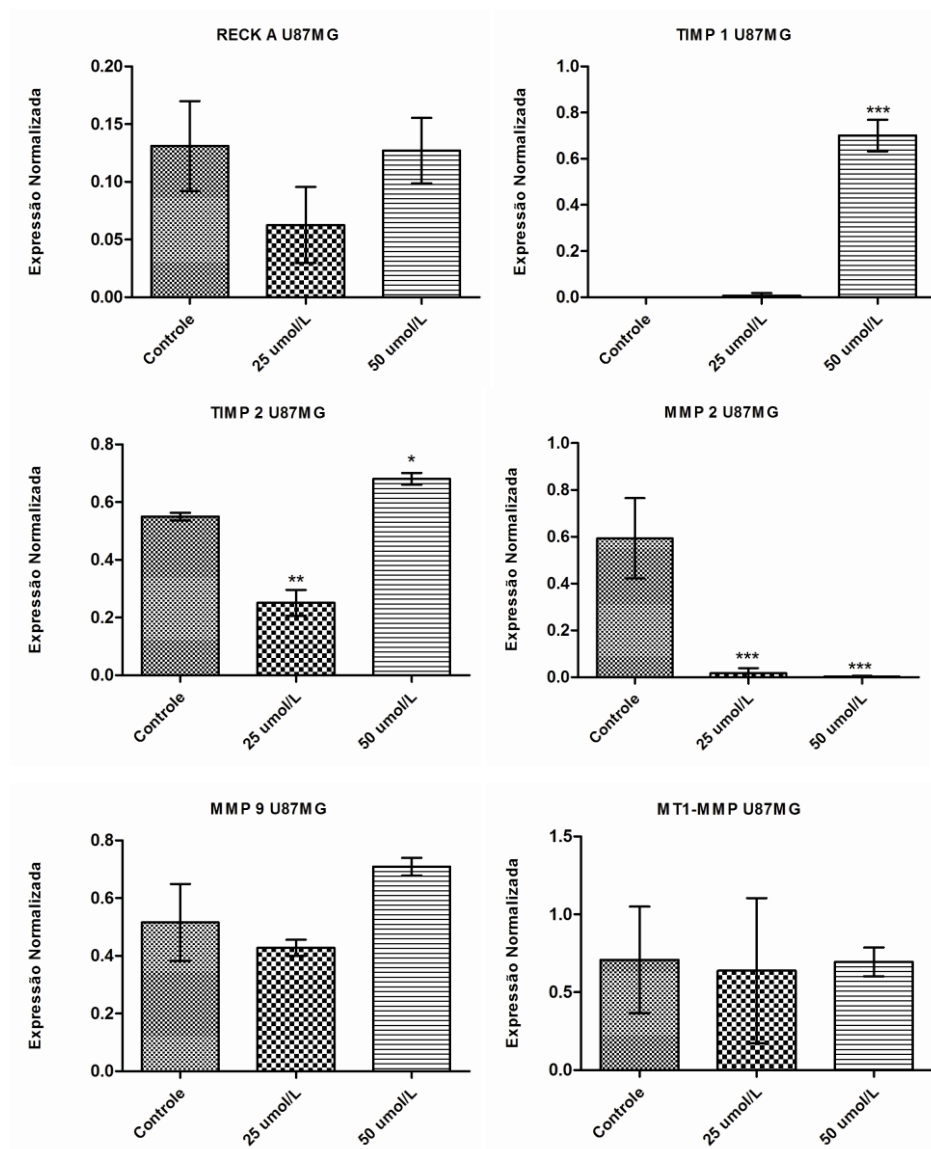


FIGURA 26: PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM U87MG FRENTE AO TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Expressão relativa dos genes *RECK* canônico (*RECK A*), *MMP 2*, *MMP 9*, *MT1-MMP*, *TIMP 1* e *2* após o tratamento com quercetina nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas. As condições controles são referentes às células tratadas com DMSO. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes analisados frente à expressão dos genes de controle interno (*hGAPDH*, *hHPRT* e *hHMBS*). ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Como visto na linhagem U373MG, em relação aos níveis de transcrito de MMPs, somente o transcrito de MMP 2 foi modulado significativamente após o tratamento das células U87MG com quercetina. Verificou-se uma diminuição bastante expressiva desse transcrito após o tratamento com quercetina nas duas doses testadas (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ). Em relação aos níveis de transcrito de *MMP 9* e *MT1-MMP* não verificou-se nenhuma modulação.

### 6.6.3 Comparação dos dados obtidos U373MG e U87MG

De forma geral, os dados obtidos a partir do tratamento das duas linhagens de glioma humano com quercetina foram bastante parecidos, tirando a ausência de detecção dos transcritos alternativos de *RECK* na linhagem U87MG.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a quercetina não foi capaz de modular a expressão do transcrito canônico de *RECK* (*RECK A*), porém promoveu um aumento significativo de *TIMP 1* em ambas as linhagens.

Em relação à expressão de *TIMP 2* foi verificado que este transcrito foi modulado de maneira distinta nas duas linhagens, aumento de expressão na U87MG e diminuição na linhagem U373MG após o tratamento com quercetina. Vale ressaltar que o aumento na expressão de *TIMP 2* pode representar uma maior ativação de *MMP 2*, já que este inibidor tem uma ação dual e uma de suas atuações é participar do complexo ternário na membrana das células capaz de ativar *MMP 2*. Neste aspecto, considerando que a linhagem U87MG é mais agressiva em comparação com a linhagem U373MG, este dado de diferença de expressão de *TIMP2* corrobora com o fenótipo apresentado pelas diferentes linhagens.

As MMPs também tiveram uma expressão bem semelhante em ambas as linhagens de glioma analisadas. Verificou-se que não houve modulação da expressão de *MMP 9* e *MT1-MMP* frente ao tratamento das células de glioma com quercetina. Em relação a modulação da expressão de *MMP 2*, verificou-se que o tratamento das células com quercetina promoveu diminuição significativa nos níveis deste transcrito.

#### 6.6.4 Quantificação comparativa dos níveis de mRNA das linhagens U373MG e U87MG

Os dados de expressão relativa das duas linhagens mantidas na condição controle foram analisados para comparar como cada gene estava sendo expresso em duas diferentes linhagens de glioma (grau III *versus* grau IV). Os resultados estão mostrados na figura 27.

O transcrito canônico RECK A teve uma maior expressão na linhagem U373MG quando comparado com a U87MG. Este dado corrobora com os achados de outros autores, que indicam que quanto maior a agressividade, invasividade e transformação tumoral, menor a expressão de *RECK* (WINNISCHOFER, 2005; TAKAHASHI et al., 1998; CORREA et al., 2006). Este resultado contribui para o potencial de *RECK* como um bom marcador de prognóstico em tumores.

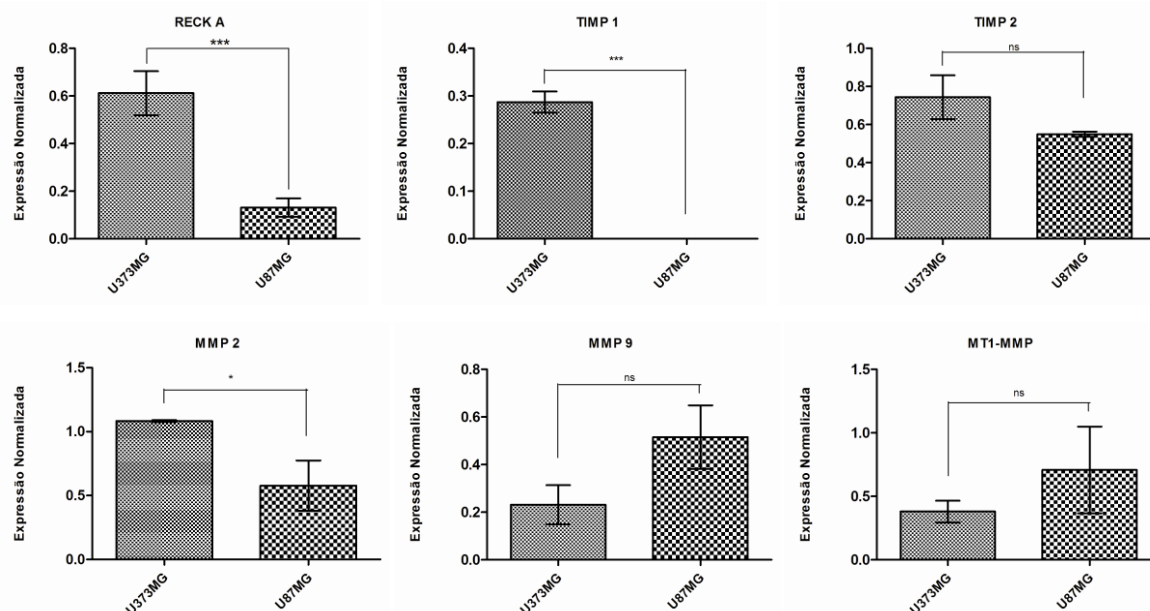


FIGURA 27: PAINEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS LINHAGENS U373MG *VERSUS* U87MG  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Expressão relativa dos genes *RECK* canônico (*RECK A*), *MMP 2*, *MMP 9*, *MT1-MMP*, *TIMP 1* e *2* somente com as células tratadas na condição controle (DMSO). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes analisados frente à expressão dos genes de controle interno (*hGAPDH*, *hHPRT* e *hHMBS*). teste t \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ .

Em relação os níveis de expressão de *TIMP 1*, é possível observar que na linhagem grau IV, a expressão relativa está diminuída em relação a grau III. A diminuição de *TIMP 1* pode estar relacionada com o perfil invasivo e agressivo desta linhagem. Já os níveis de *TIMP 2* não apresentaram diferenças entre as expressões relativas das duas linhagens analisadas.

Os níveis dos transcritos de MMP 9 e MT1-MMP não apresentaram diferenças significativas entre as duas linhagens de glioma com os dois graus de agressividade analisados, porém percebemos uma tendência de maior expressão de ambos os transcritos dessas MMPs na linhagem mais agressiva. Em relação à expressão de *MMP 2*, houve diferença significativa na expressão desse transcrito entre as células U373MG e U87MG.

#### 6.6.5 Análise da Razão Inibidores/MMPs

O equilíbrio entre MMPs e seus inibidores pode ser demonstrado pela razão entre o inibidor e a MMP. Se o valor da razão estiver perto, ou for igual a 1, tem-se um equilíbrio entre as quantidades de inibidor e MMP. Quanto maior a razão, maior a quantidade do inibidor em relação à MMP analisada. As representações gráficas das razões das linhagens U373MG e U87MG estão representadas nas figuras 28 e 29 respectivamente.

Através da análise dos resultados obtidos pode-se concluir que as razões dos inibidores/MMP 2 nas linhagens U373MG e U87MG aumentam quando as células são tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas, o que não é observado quando as células são tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina.

Em relação à MMP 9 somente quando as células U373MG são tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina ocorre uma diminuição da razão *TIMP 2*/MMP 9, nas outras análises para esta MMP não foi observado modulação com o tratamento. Para a linhagem U87MG, foi observado um aumento na razão *TIMP 1*/MMP 9 quando as células foram tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina e uma diminuição da razão *TIMP 2*/MMP 9 somente na dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, sendo que esta diminuição também foi observada na linhagem U373M

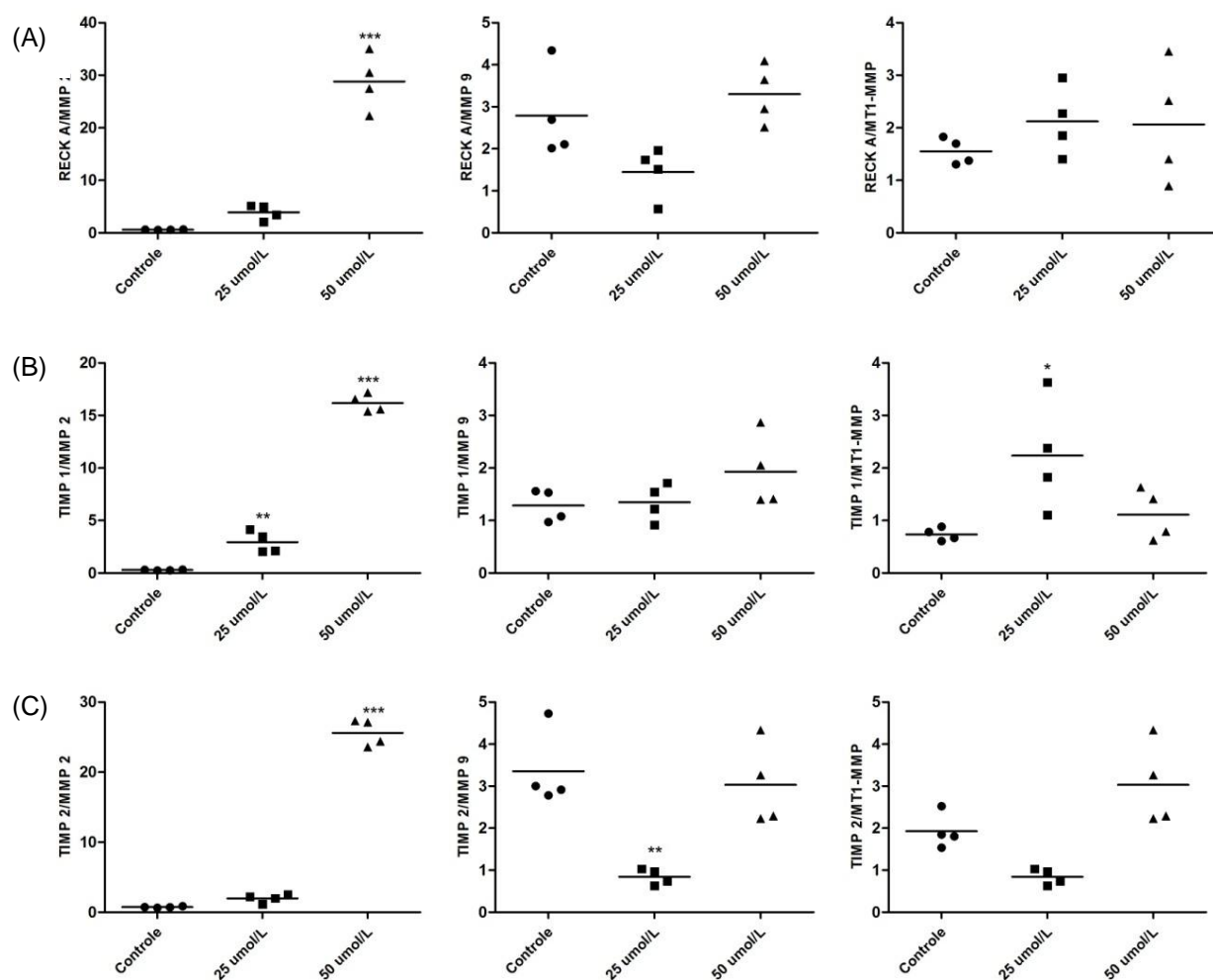


FIGURA 28: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM U373MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Gráfico das razões dos inibidores/MMPs (2, 9 e MT1-MMP). Fileiras: (A) RECK A, (B) TIMP 1 e (C) TIMP 2. Resultados representam a média das razões de quatro experimentos independentes. ANOVA, \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

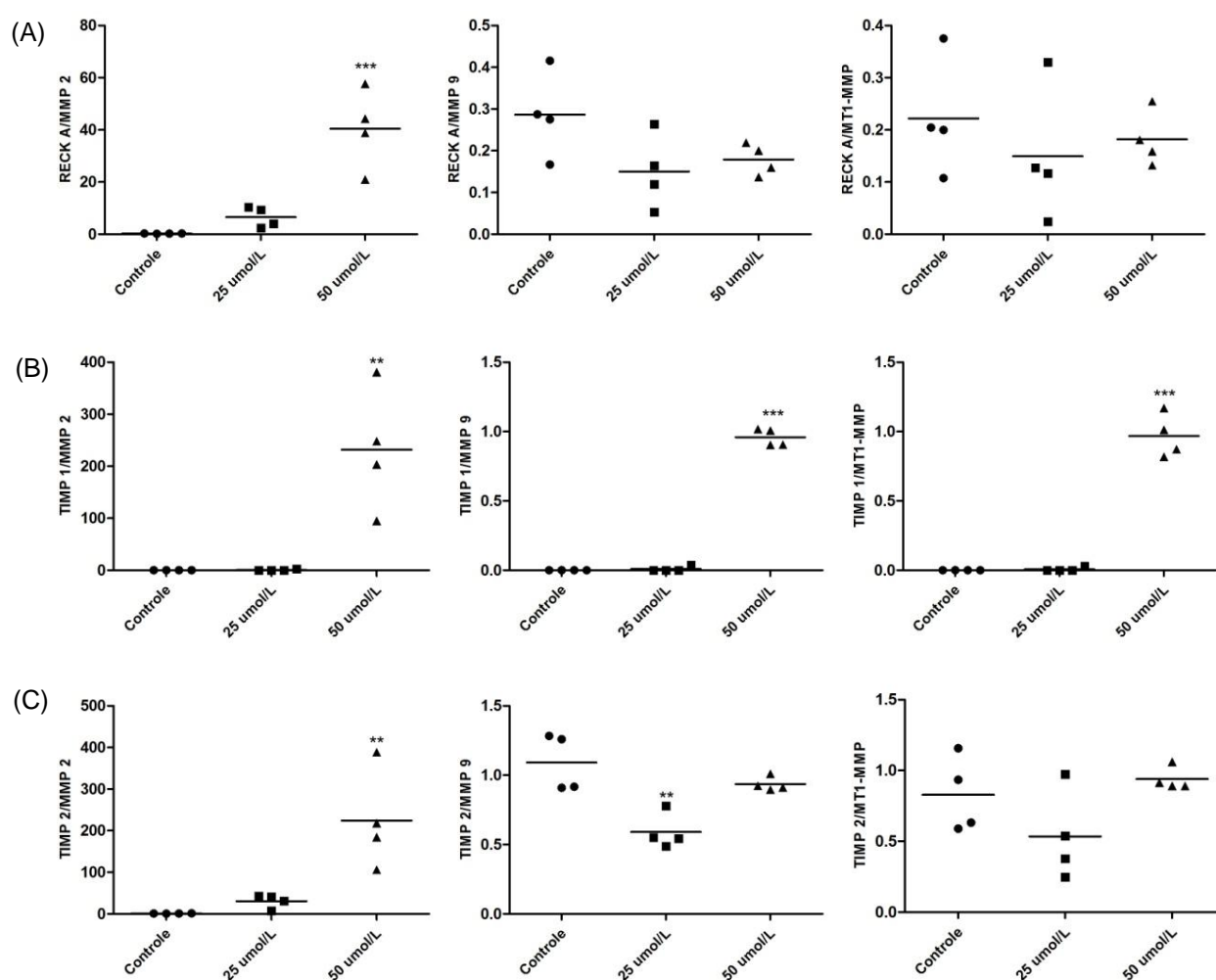


FIGURA 29: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM U87MG.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Gráfico das razões dos inibidores/MMPs (2, 9 e MT1-MMP). Fileiras: (A) RECK A, (B) TIMP 1 e (C) TIMP 2. Resultados representam a média das razões de quatro experimentos independentes. ANOVA, \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01.

Para a MT1-MMP somente a razão TIMP 1/MT1-MMP quando as células U87MG foram tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina teve um aumento significativo. As outras razões não foram moduladas com o tratamento nas duas linhagens testadas.

Os resultados obtidos nestas análises indicam que após o tratamento das células U373MG e U87MG com quercetina ocorre uma maior disponibilidade dos transcritos dos inibidores RECK A, TIMP 1 e TIMP 2 em relação ao transcrito de MMP2. Para determinar a atividade desta enzima frente ao tratamento com quercetina, nosso próximo ensaio foi a avaliação da função proteolítica de MMP 2 por zimografia gelatinosa.

## 6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES (MMPs)

Além da análise da modulação da expressão dos diferentes transcritos correspondentes às MMPs mediados pelo tratamento com quercetina, a atividade proteolítica das enzimas MMP 2 e 9 foram avaliadas nas células de glioma humano por zimografia gelatinosa (item 5.8.1 da seção Materiais e Métodos). Esta técnica permite avaliar a atividade das proteases MMP 2 e 9. Ela consiste em uma eletroforese SDS-PAGE que separa pelo peso molecular as enzimas em um gel de poliacrilamida com gelatina. Após a separação este gel é incubado na presença de zinco (co-fator) favorecendo a degradação da gelatina pelas MMPs.

### 6.7.1 Zimografia U373MG

O resultado deste ensaio está disposto na figura 30. Ressaltamos que não houve detecção da banda correspondente a enzima MMP 9 nos quatro experimentos independentes realizados, tanto na condição controle (células U373MG tratadas com o veículo DMSO) quanto nas condições experimentais onde as células foram tratadas com quercetina.

O tratamento das células U373MG com quercetina promoveu diminuição significativa da atividade da enzima MMP 2 de maneira dose dependente quando comparado com seu controle. As células U373MG quando tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas apresentaram uma diminuição na atividade de MMP 2 de 32,05% ( $p < 0,05$ ), quando tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina a atividade de MMP 2 teve uma redução ainda maior, de 60,28% ( $p < 0,001$ ) (FIGURA 30B).

Os resultados obtidos nesse ensaio corroboram os dados obtidos da análise de expressão gênica (FIGURA 24). Permitem-nos concluir que a quercetina é capaz de modular a expressão e atividade da gelatinase MMP 2 de maneira dose dependente nas células de glioma humano U373MG.

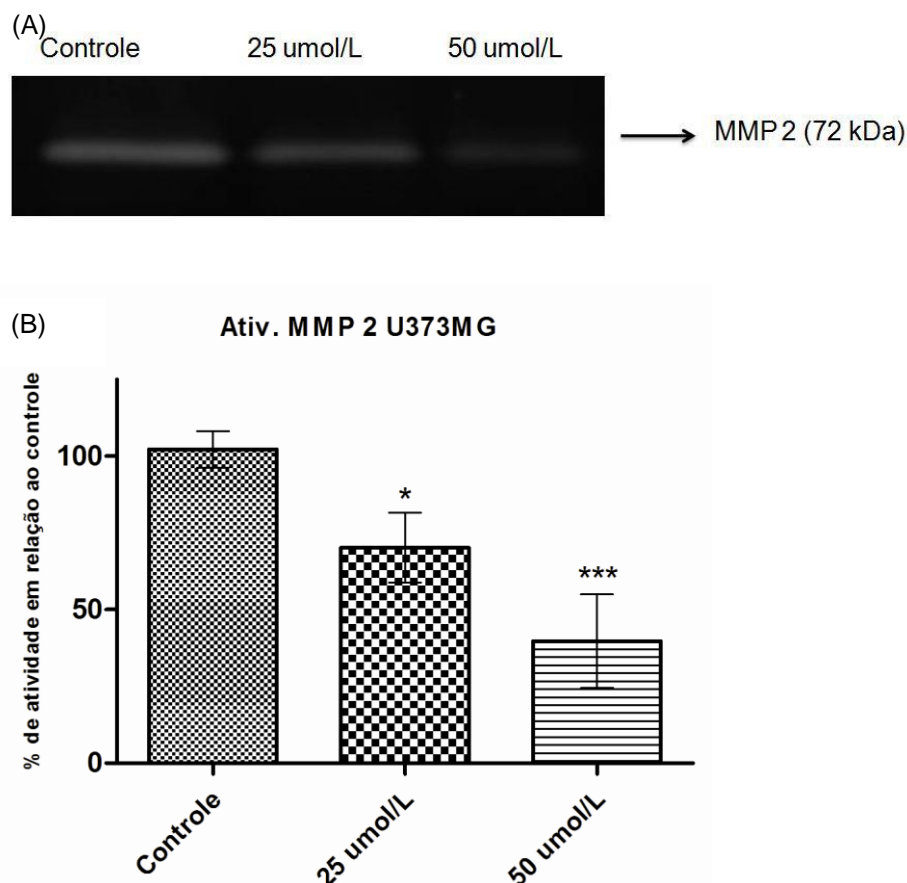


FIGURA 30: ZIMOGRRAFIA GELATINOSA DA LINHAGEM U373MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As células após o tratamento com quercetina (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas) foram submetidas a zimografia gelatinosa, a condição controle refere-se ao tratamento com o veículo do flavonóide. Em A) Zimograma representativo obtido. Em B) Quantificação da atividade de MMP 2 por densitometria, resultados de três experimentos independentes feitos em duplicatas. ANOVA, seguido de teste Tukey, \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ .

### 6.7.2 Zimografia U87MG

As células U87MG foram tratadas com quercetina (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas) e o sobrenadante foi coletado e analisado por zimografia gelatinosa. Os resultados estão dispostos na figura 31. É importante ressaltar que também não houve detecção da banda correspondente à MMP 9, sendo detectada somente a banda de 72 kDa (correspondente à MMP 2).

O tratamento das células U87MG com quercetina promoveu diminuição significativa da atividade de MMP 2 de maneira dose dependente quando



comparado com seu controle. As células quando tratadas com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas apresentaram uma diminuição na atividade de MMP 2 de 20,68% ( $p < 0,05$ ), quando tratadas com 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina a atividade de MMP 2 teve uma redução de 30,29% ( $p < 0,01$ ) (FIGURA 31B).

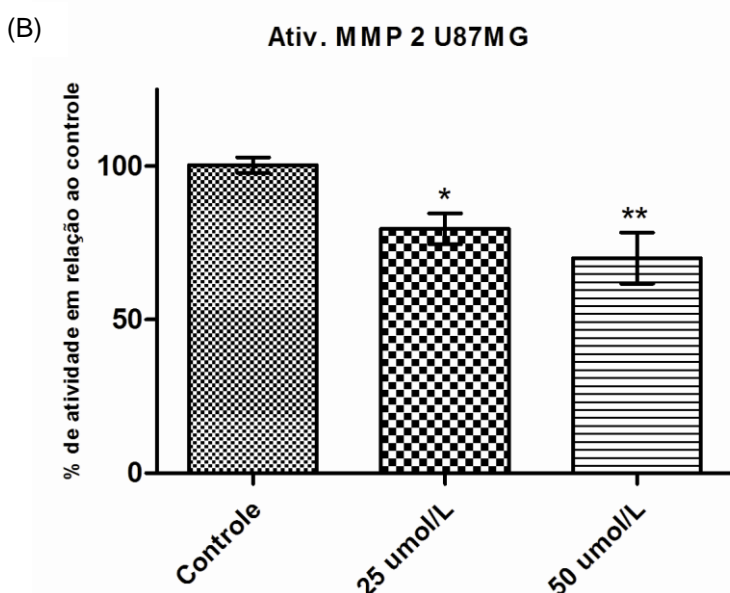
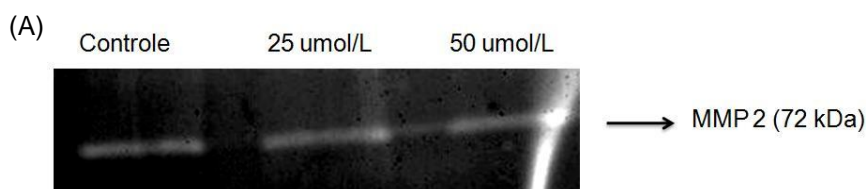


FIGURA 31: ZIMOGRÁFIA GELATINOSA DA LINHAGEM U87MG APÓS O TRATAMENTO COM QUERCETINA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As células após o tratamento com quercetina (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas) foram submetidas a zimografia gelatinosa, a condição controle refere-se ao tratamento com o veículo do flavonóide. Em A) Zimograma representativo obtido. Em B) Quantificação da atividade de MMP 2 por densitometria, resultados de três experimentos independentes feitos em duplicatas. ANOVA, seguido de teste Tukey, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos corroboram com a análise de expressão gênica (FIGURA 26) e permitem-nos concluir que a quercetina é capaz de diminuir a expressão e atividade da gelatinase MMP 2 de maneira dose dependente nas células de glioma humano U87MG.

### 6.7.3 Comparação atividade de MMP 2 entre as linhagens

Os resultados da inibição da atividade de MMP 2 mediados pela quercetina foram observados em ambas as linhagens de glioma humano, corroborando com os dados publicados do potencial de inibição de MMPs por este flavonóide, tanto a nível de expressão quanto atividade (KONG et al., 2008; ANNABI et al., 2002; VIJAYABABU et al., 2006). Interessante ressaltar que ao analisar o nível de atividade de MMP 2 nas duas linhagens independente do tratamento com quercetina (análise somente da condição controle), nós observamos um perfil que confirma os dados de expressão gênica desta enzima. A linhagem U373MG apresentou maiores níveis de mRNA de *MMP 2* em relação à U87MG (FIGURA 27), e possui uma maior atividade desta collagenase, os resultados estão mostrados no gráfico da figura 32.

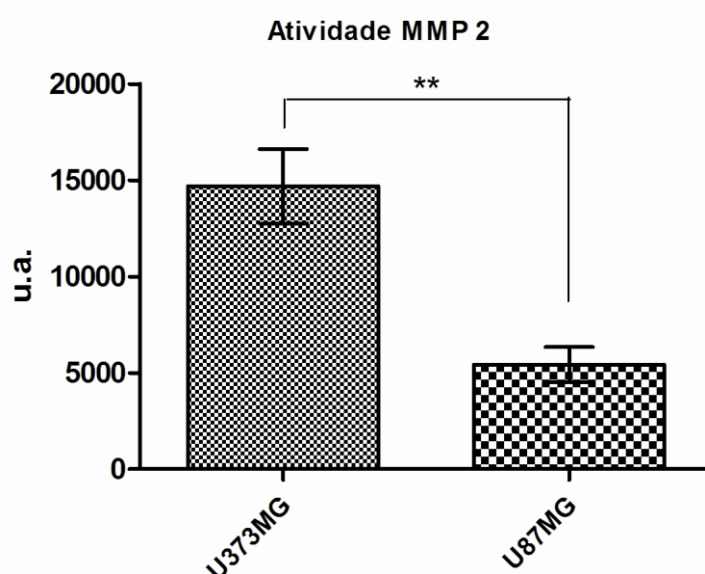


FIGURA 32: ATIVIDADE DE MMP 2 U373MG VERSUS U87MG

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As células na condição controle (DMSO) tiveram seu sobrenadante submetido a zimografia gelatinosa. Quantificação da banda de 72 kDa por densitometria. Resultados de três experimentos independentes feitos em duplicatas. Teste t, \*\*  $p < 0,01$ .

## 7 DISCUSSÃO FINAL

Os gliomas malignos representam os mais comuns e devastadores tipos de tumores primários no SNC (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; MINNITI et al., 2009; VERMA, 2009). Uma das características dos gliomas é sua alta capacidade de invadir regiões adjacentes ao tumor, fazendo com que a sobrevida média do paciente fique em torno de 9 – 15 meses (MINNITI et al., 2009; STUPP et al., 2005). As metaloproteases de matriz extracelular, enzimas responsáveis por degradação de matriz extracelular, estão diretamente relacionadas com o perfil invasivo e agressivo dos gliomas (LEVICAR; NUTALL; LAH, 2003). Elas geralmente estão altamente expressas e com atividade acima do normal nos tecidos tumorais, facilitando a invasão (NAKADA; OKADA; YAMASHITA, 2003).

As metaloproteases de matriz podem ter sua atividade inibida por 3 diferentes classes de moléculas: (1)  $\alpha_2$  – macroglobulina, glicoproteína presente no plasma, (2) pelos seus respectivos inibidores teciduais, conhecidos como TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), e pela proteína RECK, uma glicoproteína que inibe diretamente as MMPs e está presente na membrana plasmática (NODA, TAKAHASHI, 2007).

As terapias atuais que empregam compostos alquilantes desenvolvem uma alta toxicidade para o paciente, desta forma, a busca por novas terapias e novos alvos moleculares é de extrema importância. Os compostos naturais da classe dos flavonóides estão presentes em vários alimentos, e a quercetina é um dos mais comuns. Ela possui várias propriedades que contribuem para a melhoria da saúde humana, entre elas está o potencial de inibir as enzimas que degradam matriz extracelular (ANNABI ET AL., 2002; LIN ET AL., 2008; ZHANG, HUANG, XU, 2004), porém os mecanismos moleculares que medeiam esse efeito não são totalmente esclarecidos.

Baseado nestas informações, e sabendo que RECK é uma proteína supressora da invasividade e está envolvida na regulação de MMPs, e a quercetina atua inibindo as metaloproteases, o foco central deste trabalho é avaliar a ação da quercetina em células de glioma humano, com ênfase na modulação dos níveis de expressão de *RECK* e seus transcritos alternativos de *splicing* e correlacionar estes dados de expressão com o fenótipo apresentado pelas células após o tratamento com o referido flavonóide. Este trabalho busca contribuir para a melhor elucidação

dos mecanismos moleculares desencadeados pela quercetina em células tumorais.

As análises de proliferação celular das células de glioma (U87MG – grau IV; U373MG – grau III; e U343MG – grau III) após o tratamento com quercetina (FIGURA 9) demonstraram que ocorre uma diminuição da proliferação celular mediada pelo flavonóide de maneira dose e tempo dependente. Baixas doses de quercetina (5 e 10  $\mu\text{mol/L}$ ) não foram capazes de diminuir a proliferação celular quando comparadas com seu respectivo controle. As células de glioma demonstraram sensibilidade ao flavonóide no tempo de 24 horas somente na maior dose de quercetina analisada (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Após 48 horas de tratamento, a linhagem U87MG foi sensível à quercetina já na dose de 25  $\mu\text{mol/L}$ , as outras duas linhagens mostraram-se sensíveis à droga a partir da dose de 50  $\mu\text{mol/L}$ . Após 72 horas de tratamento com quercetina, as células de glioma apresentaram queda na proliferação de maneira significativa em todas as doses avaliadas.

Os nossos resultados de proliferação celular corroboram com os dados de Braganhol et al. (2006), Zamin et al. (2009) e Kim et al. (2008), esses autores testaram o potencial da quercetina em diminuir a proliferação de diferentes células de glioma humano. Kim et al. (2009) observou em células A172 (glioma humano baixo grau) que o tratamento com quercetina na concentração de 50  $\mu\text{mol/L}$  após 48 horas foi capaz de reduzir a proliferação destas células em cerca de 36% o que condiz com o que foi observado por nós para a linhagem U87MG (35,4%); já Zamin et al. (2009) utilizaram a mesma linhagem U87MG e verificaram que após 48 horas de tratamento com quercetina na concentração de 100  $\mu\text{mol/L}$  a queda na proliferação celular foi de cerca de 50%. Estes dados estão de acordo com nossos resultados, onde nesta mesma condição de tempo e concentração do flavonóide encontramos uma redução de viabilidade em 52,22%. Ainda, Braganhol et al. (2006) ao analisar a viabilidade de células de glioma U138MG (baixo grau) após tratamento com quercetina demonstrou uma redução de 52% na viabilidade quando as células foram tratadas com 100  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 24 horas.

Nossos dados, em conjunto com os resultados obtidos por outros autores, sugerem a quercetina como um promissor fármaco natural para diminuição do potencial proliferativo de tumores, em especial de gliomas (ZAMIN et al., 2009; BRAGANHOL et al., 2006; KIM et al., 2008).

Um mecanismo descrito na literatura da ação antitumoral da quercetina é a indução de parada de proliferação celular na fase G1-S do ciclo celular. Nossos

resultados mostraram que o tratamento das células de glioma (U87MG e U373MG) com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas foi capaz de aumentar a quantidade de células na fase G1 do ciclo celular. Resultado que está de acordo com dados obtidos por outros autores. Jeong et al. (2009) analisou o efeito do tratamento da quercetina em linhagens de mama e observou que baixas doses do flavonóide induziram uma parada do ciclo celular em G1, sendo este efeito considerado como o principal fator que contribuiu para a característica anti-proliferativa da quercetina. Suh et al. (2010) também observou um aumento da porcentagem de células de osteossarcoma na fase G1 do ciclo celular após o tratamento com quercetina (10 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ) por 48 horas. Ainda, Kim et al. (2010) analisou o efeito do tratamento de células HT-29 (tumor de cólon) com quercetina nas doses de 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  por 24 horas e o efeito observado foi também um aumento da porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular (60,1 e 66,2%, respectivamente).

Como descrito no item 2.2.2.5 (Revisão Bibliográfica) a proteína pRB em conjunto com as ciclinas D e E controlam a transição das células da fase G1 para a fase S. Recentes dados da literatura mostram que o tratamento com quercetina em células de osteossarcoma promoveu diminuição da expressão de ciclina D (desta forma mantendo pRB hipofosforilada) e causou parada de proliferação na fase G1 do ciclo celular (SUH et al., 2010). O papel desenvolvido por ciclinas e CDKs no mecanismo de ação mediado por quercetina em células de glioma humano é ainda uma questão a ser analisada e segue como uma perspectiva de estudo do presente trabalho.

Verificamos ainda que a quercetina não foi capaz de induzir morte por apoptose nem necrose nas células de glioma quando tratadas nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas (FIGURAS 15 e 17). Estes dados são bem interessantes e condizem com outros achados na literatura. Jakubowicz-Gil et al. (2010) ao tratar células de astrocitomas com quercetina (30  $\mu\text{mol/L}$  por 24 horas) percebeu um aumento da porcentagem de células necróticas. Braganhol et al. (2006) também observou indução de morte por necrose e apoptose utilizando o tratamento com 100  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina em células de glioma U138MG. Esses trabalhos utilizam doses elevadas de quercetina. Em comparação aos nossos dados, o tratamento das células de glioma com doses baixas de quercetina não causou morte celular, promoveu somente um aumento da porcentagem de células na fase G1, resultado que também foi encontrado por Jeong et al. (2009) em um

estudo utilizando células de câncer de mama, indicando que doses baixas desse agente atua especificamente sobre a progressão do ciclo celular.

Como muitos autores relataram efeitos celulares distintos no mecanismo de morte dependendo da dose do flavonóide utilizada (BRAGANHOL et al., 2006; JAKUBOWICZ-GIL et al., 2010; VARGAS, BURD, 2010), nós decidimos avaliar o efeito do tratamento das células de glioma com uma dose bem alta de quercetina para ver qual seria o perfil apresentado pelas mesmas. Ao expor as células de glioma à 200  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas observamos que este tratamento induziu morte celular por necrose em ambas as linhagens, corroborando os dados apresentado por Vargas e Burd (2010) onde os autores descrevem que acima de 40  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina ocorre geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzindo necrose.

Ainda citando Vargas e Burd (2010), a quercetina atua promovendo a ativação da caspase-3 e inibição da expressão de survivina, induzindo a apoptose das células tumorais. O tratamento das células de câncer de próstata (PC-3, LNCaP e DU-145) com altas doses de quercetina pode causar o estresse de retículo endoplasmático (RE), por inibir os níveis de HSP90 (uma proteína do choque térmico relacionada com o estresse do RE). A consequência do estresse é a liberação de cálcio e componentes pró-apoptóticos, levando a célula a apoptose e também a necrose tardia (AALINKEEL et al., 2008; TAIYAB; SREEDHAR; RAO, 2009).

Após os ensaios de análise de ciclo e morte celular, tínhamos indícios bastante evidentes de que o tratamento das células de glioma com baixas doses de quercetina estava causando parada de proliferação, sem levar à morte celular, sugerindo um efeito citostático. Para comprovar nossa hipótese, fizemos ainda um ensaio de recuperação das células de glioma após o tratamento com quercetina, onde mensurávamos o potencial de recuperação das células. Os resultados apresentados pelas duas linhagens testadas (U87MG e U373MG) mostraram que após a interrupção do tratamento com quercetina as células voltavam a proliferar de maneira bastante parecida com as células da condição controle. Este resultado permite a sugestão de que, se a quercetina estivesse causando um dano muito agressivo nas células (que pudesse promover eventos de necrose ou apoptose) a capacidade de recuperação das células tratadas seria afetada, o que não foi evidenciado por estas análises (FIGURA 18).

Nossos dados mostram ainda que o tratamento das células de glioma com quercetina promoveu inibição da migração celular em ambas as linhagens na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  após 24 e 48 horas de tratamento. A linhagem de glioma grau IV quando tratada com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas apresentou o mesmo comportamento das células na condição controle, ou seja, nesta dose e tempo o flavonóide não foi capaz de inibir a migração da célula mais agressiva. A linhagem U373MG teve sua migração inibida tanto na dose de 25 quanto em 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina (FIGURAS 19 e 21). Estes dados corroboram os resultados de proliferação (curva de sobrevivência e ciclo celular) e contribuem para a hipótese de que a quercetina apresenta um potencial quimiopreventivo (a utilização de doses baixas ao longo do tempo, prevenindo os processos de carcinogênese (LE MARCHAND, 2002)).

Em 2010, Correa et al., demonstrou que células T98G (glioma grau IV) quando transfectadas com um vetor contendo o cDNA correspondente à porção codificante do gene *RECK* tiveram uma diminuição na capacidade de migração e invasão celular. Sabendo que RECK é um inibidor de MMPs e que a quercetina é capaz de modular a ação dessas metaloproteases, decidimos verificar se o mecanismo pelo qual a quercetina é capaz de inibir a atividade de MMPs poderia ser via modulação da expressão do gene *RECK*. A quantificação dos níveis de mRNA dos transcritos de *RECK* (forma canônica e transcritos alternativos de splicing), em comparação com os níveis de transcrito de MMPs e de seus inibidores clássicos TIMPs, foi realizado nas células U373MG e U87MG após o tratamento com o flavonóide.

Os dados de expressão de *RECK* canônico (*RECK A*) mostraram que em ambas as linhagens não ocorrem modulação deste transcrito mediado pelo tratamento com quercetina (FIGURAS 24 e 26). Quando analisado a expressão basal de *RECK A*, podemos perceber que a linhagem U373MG (grau III) possui uma maior quantidade deste transcrito em relação à linhagem U87MG (grau IV) (FIGURA 28), confirmando que em células com um perfil mais agressivo a expressão de *RECK A* é diminuída (CORREA et al., 2006; WINNISHOFER, 2005; NODA e TAKAHASHI, 2007), contribuindo para o potencial de marcador de prognóstico em tumores.

Interessantemente, o tratamento com quercetina, na linhagem U373MG levou a uma modulação negativa dos transcritos alternativos *RECK B* e *D*. Dados similares

à este foram encontrados em nosso laboratório por outros membros do nosso grupo de pesquisa: Barbosa (2010) e Kenski (2010) que utilizaram o agente antitumoral sinvastatina em modelo de melanoma e glioma, respectivamente, e verificaram a modulação negativa de RECK B (sem modulação dos níveis transcricionais de RECK canônico) concomitante à indução de inibição de proliferação e indução de parada na fase G1 do ciclo celular. De forma muito interessante, outro aluno do nosso grupo (Jacomasso, 2010) analisou a expressão de RECK A e RECK B em um painel de 10 linhagens de melanoma humano que representam os diferentes graus de progressão maligna e observou um aumento significativo nos níveis de RECK B, em comparação com o transcrito canônico, no grupo de células metastáticas, levando o autor a sugerir que o produto protéico codificado pelo gene *RECK B* possa ter uma atuação pró-tumoral, diferentemente de RECK A.

Vale ressaltar que a proteína RECK A por estar ancorada à membrana plasmática pode ter uma função local de inibir MMPs, diferentemente dos inibidores teciduais (TIMPs) que são solúveis. Essa característica faz com que RECK A tenha uma proteólise local, direcionada para a região de seu ancoramento. Sabendo que os mecanismos de *splicing* promovem uma amplitude de modular a expressão gênica distintamente, ou seja, vários genes que possuem transcritos alternativos podem apresentar funções distintas, ou até oposta destes transcritos, nos leva a sugerir que RECK B (que codifica para uma proteína com possível ancoramento GPI, semelhante a proteína canônica (LIMA et al., 2009)) tenha uma função distinta ou até oposta à RECK A. Nossa sugestão é que RECK B esteja possivelmente presente em locais similares aos da isoforma canônica de RECK e, de certa forma, esteja competindo com RECK-A pelo mesmo sítio de localização na membrana plasmática. Nesse sentido, a ação da quercetina em promover a inibição significativa de RECK-B pode estar indiretamente promovendo a maior atuação de RECK-A nas células e, desta forma, contribuindo para a modulação negativa de MMPs. Relacionando a observação de Omura et al. (2009) de que a proteína RECK A forma dímeros na superfície celular pode-se ainda sugerir que talvez RECK B seja capaz de formar um dímero com RECK A, porém como RECK B é menor, a cavidade do possível dímero formado RECK A-RECK B não seria adequada para interagir com outras proteínas. Vale ressaltar que RECK B não possui os domínios inibidores de serina proteases, que estão envolvidos na inibição de MMPs, corroborando com nossa hipótese.



Outro transcrito alternativo (RECK D), também apresentou uma regulação negativa após o tratamento com quercetina na linhagem U373MG, também levantando a hipótese de uma regulação entre as duas isoformas, porém RECK D não possui ancoramento GPI, sugerindo uma possível regulação em nível de sinalização celular que necessita de maiores estudos.

Como já foi mostrado na seção anterior desta dissertação (RESULTADOS E DISCUSSÃO), não houve a detecção das isoformas de RECK (RECK B e RECK D) na linhagem U87MG. Este resultado leva o leitor a pensar que desta maneira a abundância de RECK A é maior e, portanto a linhagem U87MG não deveria mostrar-se tão agressiva, mas devemos ressaltar que os resultados de expressão basal de RECK A (FIGURA 27) mostram que este transcrito é muito menos expresso nestas células em relação à linhagem de glioma grau III (U373MG) e nos leva a sugerir que seus transcritos alternativos estão em níveis bem baixos (que nem detectamos), ou quem sabe, nem ocorra o processamento alternativo, visto que este mecanismo varia de forma tecido-específica e nem sempre ele ocorre (LODISH et al.,2005).

Avaliamos ainda a modulação da expressão de MMPs 2, 9 e 14 (MT1-MMP) frente ao tratamento com quercetina nas células de glioma (FIGURAS 24, 26 e 27). Os resultados indicaram que em ambas as linhagens houve uma diminuição significativa nos níveis de mRNA do gene que codifica para a enzima MMP 2 após o tratamento com quercetina. Já para os transcritos correspondentes à MMPs 9 e 14 (MT1-MMP) não foi verificado a modulação da expressão gênica mediados pela quercetina nas células analisadas. Resultados similares foram obtidos por KONG et al. (2008) utilizando células de fibrossarcoma humano tratadas com isorhamnetina (10  $\mu\text{mol/L}$  por 1 hora), onde os níveis de expressão de MMP 2 também foram significativamente diminuídos.

A modulação da expressão dos inibidores teciduais de MMPs 1 e 2 (TIMP 1 e 2) também foram avaliados neste estudo frente ao tratamento com quercetina (FIGURAS 25, 27 e 38). Na linhagem U373MG o tratamento com 25  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina promoveu um aumento significativo nos níveis de mRNA de TIMP 1, porém esse aumento não foi mantido quando as células foram tratadas com a dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina, já na linhagem U87MG o aumento de TIMP 1 foi bem expressivo na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$ . Vale ressaltar que o aumento de TIMP 1 também foi visto por KONG et al. (2008) após o tratamento de células de fibrossarcomas com quercetina e isorhamnetina.

Em relação a modulação de expressão de TIMP 2, foi verificado que o tratamento com quercetina na dose de 25  $\mu\text{mol/L}$  provocou uma queda nos níveis deste inibidor. É importante ressaltar que TIMP 2 além de atuar inibindo MMPs atua na própria ativação de MMP 2, sendo assim, a diminuição dos níveis deste transcrito pode indicar uma queda no potencial ativador de MMP 2.

Porém utilizando o tratamento na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina na linhagem mais agressiva os níveis de TIMP 2 aumentam significativamente, evidenciando o papel dual de TIMP 2 (inibidor e ativador do processamento de MMP).

Um parâmetro importante para avaliar o equilíbrio proteolítico ao qual as células estão sendo expostas em uma determinada condição é o cálculo da razão entre a expressão dos inibidores e a expressão de MMPs. Com a finalidade de analisar esse balanço proteolítico foram realizadas estas análises antes e após o tratamento das células de glioma com quercetina (FIGURAS 28 e 29). De modo geral, pode-se constatar que a razão inibidores/MMP 2 encontra-se aumentada após o tratamento de ambas as células com quercetina, considerando qualquer dos inibidores avaliados neste estudo. Já para a razão inibidores/MMP 9, verifica-se que após o tratamento com quercetina, somente há aumento da razão TIMP 1/MMP 9 na linhagem U87MG, e diminuição da razão TIMP 2/MMP 9, esta última também encontra-se diminuída na U373MG. Em relação à MT1-MMP observou-se um aumento da relação TIMP 1/MT1-MMP após o tratamento com quercetina nas células U87MG e U373MG. Nossos dados permitem a sugestão de que o deslocamento do balanço proteolítico envolvendo os inibidores (RECK A, TIMP 1 e TIMP 2) e principalmente MMP 2 deve contribuir para as ações antitumorais exercidas pela quercetina. Vale ressaltar que Nasser et al. (2006) ao analisarem um painel de 27 amostras de pacientes com gliomas, observaram que há uma relação direta entre os baixos níveis de mRNA de TIMP 1 com a malignidade dos gliomas, desta forma, o aumento de TIMP 1 provocado pela quercetina pode correlacionar com um melhor prognóstico, corroborando com seus efeitos quimiopreventivos.

A atividade das enzimas MMPs foi avaliada por zimografia gelatinosa. Como já citado, somente a banda correspondente a MMP 2 teve atividade enzimática no gel de gelatina. Foi verificado que após o tratamento com quercetina as duas linhagens apresentaram diminuição da atividade de MMP 2 (FIGURAS 30, 31 e 32).

Os resultados de atividade enzimática confirmaram os dados obtidos de

modulação de expressão gênica de MMP 2, evidenciando que a quercetina foi capaz de modular a expressão e atividade de MMP 2 em modelo de glioma, e podemos sugerir que a quercetina pode exercer esse efeito, pelo menos em parte, mediado pelo aumento de TIMP 1 e diminuição dos transcritos alternativos RECK B e D, o que contribuiria para maior disponibilidade e/ou atividade de RECK A.

Diante dos nossos dados podemos concluir que o tratamento das células de glioma U373MG e U87MG com quercetina promoveu uma diminuição na proliferação celular com parada de ciclo celular na fase G1. De forma interessante, foi verificado que a superexpressão de RECK promove um retardo na hiperfosforilação de pRb, alterando a progressão do ciclo celular, mantendo as células na fase G1 (WINNISCHOFER, 2005). Podemos então sugerir que a quercetina esteja promovendo parada das células de glioma na fase G1 do ciclo celular por alterar, entre outros possíveis fatores, a expressão de RECK e de ciclina D. O tratamento com quercetina provocou uma diminuição na migração celular, assim como a superexpressão de RECK causou em gliomas A172 e T98G (CORREA et al., 2010), corroborando com a nossa hipótese de que o tratamento com quercetina diminui a expressão de RECK B, favorecendo RECK A na linhagem U373MG e juntamente com a diminuição de MMP 2 e aumento de TIMP 1 condizem com o fenótipo observado. Porém na linhagem U87MG não houve a detecção dos transcritos alternativos, mesmo assim, após o tratamento com quercetina observamos uma diminuição na proliferação celular, parada na fase G1 do ciclo celular, diminuição na migração celular, não houve modulação de RECK A, porém observamos, diminuição de MMP 2 e aumento de TIMP 1. Vale ressaltar que o aumento de TIMP 1 ocorre justamente nas doses de tratamento com quercetina onde foi observado diminuição da migração celular em ambas as linhagens (50  $\mu\text{mol/L}$ , 48 horas).

A via da proteína quinase C (PKC) está constitutivamente ativa em gliomas e outros tumores, ela participa ativando a via MAPK/ERK (ZHANG; HUANG, XU, 2004) e como consequência ocorre os estímulos mitogênicos e ativação de MMPs. Embasados na literatura e nos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir um modelo de regulação para o fenótipo observado em nossos experimentos.

Levando em consideração:

- que vários autores descrevem que a quercetina atua como um inibidor da PKC (ZHANG; HUANG, XU, 2004; LIN et al., 2008; MATCHETT et al., 2006), consequentemente este efeito provoca a inibição de MMPs;
- que a quercetina pode atuar inibindo diretamente a atividade de MMPs pela ligação ao sítio catalítico destas enzimas (SARAGUSTI et al., 2010);
- que a atividade de PKC interfere no balanço MMP/TIMP (YANG et al., 2009);
- que ERK atua como um repressor na transcrição do gene RECK (SASAHARA et al. 1999a, 1999b e 2002) e;
- que a proteína RECK tem como principal função inibir MMPs (WELM; MOTT; WERB, 2002).

Podemos sugerir neste modelo que a quercetina pode atuar inibindo a PKC, desta forma diminuindo a atividade de ERK, que por sua vez pode favorecer a transcrição de RECK, deixando-o livre para exercer sua função de supressor tumoral de MMPs. Yang et al. (2009) ao inibir especificamente a PKC, observou um aumento nos níveis de TIMP 1, a quercetina ao inibir essa quinase, também pode aumentar os níveis de mRNA de TIMP 1 (como observado neste trabalho), contribuindo para a inibição da atividade de MMP. A detecção de RECK B, e a observação da regulação negativa deste gene pela quercetina e correlacionando com a hipótese que RECK B pode interagir com RECK A, nos sugerimos o esquema a seguir (FIGURA 33):

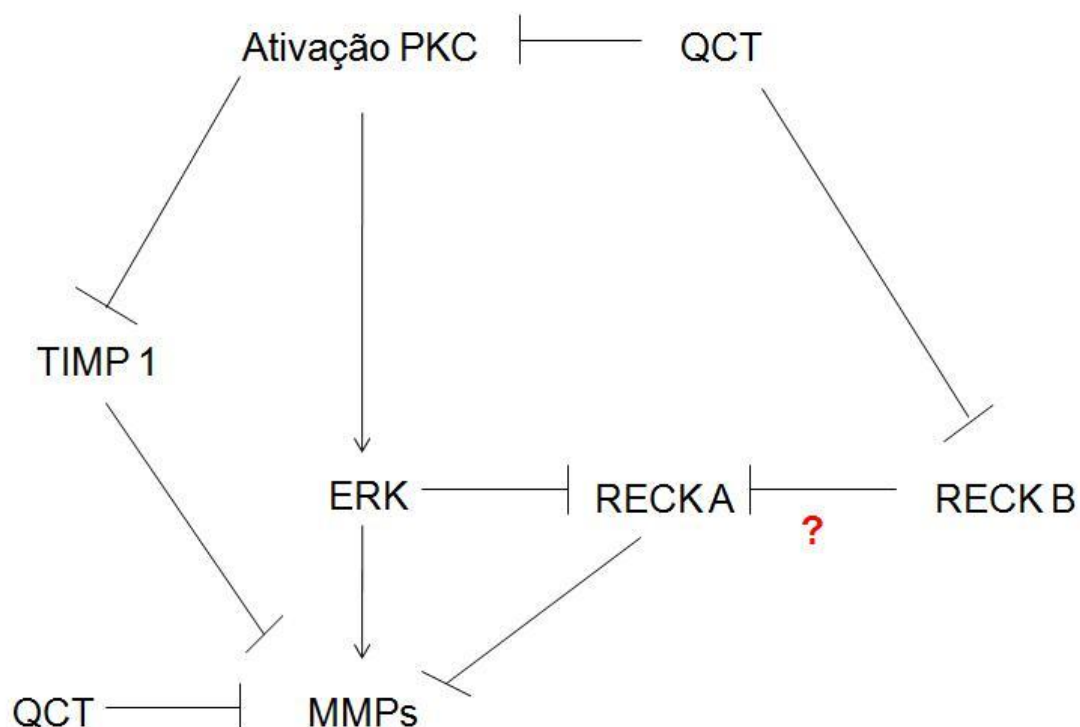


FIGURA 33 – PROPOSTA DE MODELO DE REGULAÇÃO DA QUERCETINA SOBRE RECK A, RECK B, TIMP 1 E MMPs EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: A quercetina (QCT) pode atuar inibindo as MMPs diretamente (SARAGUSTI et al., 2010) e também inibindo a proteína quinase C (PKC) que está constitutivamente ativa em tumores e participa da via MAK/P/ERK (ZHANG; HUANG, XU, 2004). ERK já foi descrito que pode atuar inibindo RECK A a nível transcricional. Nossos dados sugerem que a quercetina inibe a transcrição de RECK B (que compete com RECK A). Desta forma a inibição da PKC e RECK B, favorece a ação de RECK A e TIMP 1, relacionado ao efeito antitumoral do flavonóide.

Vale ressaltar que este esquema é uma sugestão e que a confirmação deste modelo deve se basear na utilização de linhagens transfectadas (superexpressão ou silenciamento) para os genes em questão. Desta forma poderemos então saber a real participação de TIMP 1, RECK A e seus transcritos frente ao tratamento com quercetina.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- A quercetina provoca uma diminuição na proliferação celular de gliomas humanos (U373MG e U87MG) de maneira dose e tempo dependente;
- O flavonóide provoca parada de proliferação celular nas células de glioma especificamente na fase G1 do ciclo celular na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas;
- Nas doses testadas de quercetina (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas) não foi observado a indução de apoptose ou necrose nas células de glioma humano, a dose de 200  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina induziu o mecanismo de morte por necrose nas células U373MG e U87MG;
- A quercetina inibe a migração celular nas células U373MG quando tratadas com 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  por 48 horas, já nas células U87MG a inibição da migração só ocorre na dose de 50  $\mu\text{mol/L}$  de quercetina por 48 horas;
- A quercetina não modula diretamente a expressão gênica de *RECK A* nas doses de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  pelo tempo de 48 horas de exposição em ambas linhagens;
- Ocorre diminuição estatisticamente significativa, dos níveis de mRNA dos transcritos alternativos *RECK B* e *D* após tratamento com quercetina por 48 horas. Esta modulação negativa pode indicar uma função distinta de *RECK B* e *D*, em relação a forma canônica de *RECK* em células de glioma humano U373MG;
- A célula U373MG possui maiores níveis do transcrito canônico *RECK A* quando comparado com a linhagem U87MG;

- Não foi visto uma modulação da expressão dos genes *MMP 9* e *MT1-MMP* nas duas linhagens analisadas após o tratamento com quercetina;
- Ocorre diminuição estatisticamente significativa dos níveis do transcrito de *MMP 2* nas células U87MG e U373MG após o tratamento com quercetina;
- Os níveis dos transcritos de TIMP 1 e TIMP 2 aumentam significativamente após o tratamento com quercetina nas células U87MG. Nas células U373MG ocorre um aumento em TIMP 1 e uma diminuição em TIMP 2;
- O tratamento com quercetina nas células de glioma promoveram um aumento da razão Inibidores/MMP 2, favorecendo o balanço proteolítico dos inibidores;
- A quercetina inibe a atividade da MMP 2 nas células de glioma U87MG e U373MG;

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALINKEEL, R. et al. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. **Prostate**, v. 68, n. 16, p.1773-1789, 1 dez. 2008.

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; van AMELSVOORT, J. M. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. **Nutrition Research**, v. 25, n. 3, p.305-317, mar. 2005.

ADER, P.; WESSMANN, A.; WOLFFRAM, S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 7, p.1056-1067, 1 abr. 2000.

AGRAWAL, S. M.; LAU, L.; YONG, V. W. MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 19, p.42-51, 2008.

AGULLO, G. et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol.**, v. 53, n. 11, p.1649-1657, 1 jun. 1997.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. **Free Radic Biol Med.**, v. 29, n. 6, p.507-514, 15 set. 2000.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALIPRANDINI, E. **Efeito da melanina e do oxigênio singlete na morte celular e fluxo de cálcio em células melan-A e B16-F10**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ALONSO, M. M. et al. E2F1 in gliomas: A paradigm of oncogene addiction. **Cancer Lett**, v. 263, n. 2, p.157-163, 18 maio 2008.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med.**, v. 3, n. 8, p.917-921, 1997.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

ANNABI, B. et al. Green tea polyphenol (3)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1542, n. 1-3, p.209-220, 2002.



BARAN, I. et al. Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. **Cell Biochem Biophys.**, v. 58, n. 3, p.169-179, dez. 2010.

BARBOSA, F. A. L. **Efeito da sinvastatina na modulação da expressão de RECK e suas isoformas em células de melanoma humano.** 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; COUTINHO, S. G. Flow cytometry in the study of cell death. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 95, n. 3, p.429-433, maio-jun. 2000.

BISCHOFF, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Curr. Opin. in Clin. Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

BLEEKER, F. E. et al. Absence of AKT1 mutations in glioblastoma. **PLoS One.** v. 4, n. 5, p. e5638, 20 maio 2009.

BODE, W. et al. Insights into MMP–TIMP Interactions. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 878, p.73-91, 1999.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol.**, v. 585, n. 2-3, p.325-337, 2008.

BOUCHET, B. P. et al. P53 as a target for anti-cancer drug development. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 58, n. 3, p.190-207, jun. 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 7, p.248-254, maio 1976.

BRAGANHOL, E. et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138M glioma cell line. **Anti-Cancer Drugs.** v. 17, p. 663-671, 2006.

CHABNER, B. A. et al. Agentes Antineoplásicos. In: BRUTON, L. L. et al. (Comp.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da Terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill, 2006. Cap. 51, p. 1185-1264.

CHAKRAVARTI, A. et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. **J Clin Oncol.**, v. 20, n. 4, p.1063-1068, 2002.

CHAKRAVARTI, A. et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. **J Clin Oncol.** v. 22, n. 10, p. 1926-1933, 15 maio 2004.

CHAN, J. A.; KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p.6029-6033, 15 jul. 2005.

CHANG, H. C. et al. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. **Cell Signal**, v. 16, n. 6, p.675-679, jun. 2004.

CHANG, H. C. et al. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. **Cancer Res**, v. 66, n. 17, p.8413-8420, 1 set. 2006.

CHANG, S. M. et al. Patterns of Care for Adults With Newly Diagnosed Malignant Glioma. **Jama**, v. 293, n. 5, p.255-564, 2005.

CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W.S. Current strategies to target p53 in cancer. **Biochem Pharmacol.** v. 80, n. 5, p. 724-730, 1 set. 2010.

CHOWDHURY, R. et al. Arsenic induced apoptosis in malignant melanoma cells is enhanced by menadione through ROS generation, p38 signaling and p53 activation. **Apoptosis**, v. 14, n. 1, p.108-123, jan. 2009.

CLARK, J. C. M. et al. RECK - a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, n. 3-4, p.675-683, 2007.

CORNARD, J. P.; DANGLETERRE, L.; LAPOUGE, C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. **J. Phys. Chem. A**, v. 109, n. 44, p.10044-10051, 19 out. 2005.

CORREA, T. C. S. et al. Downregulation of the RECK-Tumor and Metastasis Suppressor Gene in Glioma Invasiveness. **J Cell Biochem.**, vol. 99, p. 156 – 167. 2006.

CORREA, T. C. S. et al. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **J Cell Biochem.**, vol. 110, n. 1, p. 52-61, maio 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, n. 1, p.1-20, 1997.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p.795-808, 1992.

DAY, A. J. et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **Febs Lett**, v. 468, n. 2-3, p.166-170, 25 fev. 2000.

de BOER, V. C. et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **J Nutr**, v. 135, n. 7, p.1718-1725, jul. 2005.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol.**, vol. 70, p. 217 – 228. 2004.

EGERT, S. et al. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. **J Nutr.**, v. 138, n. 9, p.1615-1621, set. 2008.

EISENBERG, I. et al. Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. **Cytogenet Genome Res.**, v. 97, p.58-61, 2002.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p.550-562, ago. 2009.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research.**, v.24, p. 851-874, 2004.

FILLMORE, H. L.; VANMETER, T. E.; BROADDUS, W. C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. **J Neurooncol.**, v. 53, n. 2, p.187-202, 2001.

FREEMAN, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. **Science**, v. 330, n. 6005, p.774-778, 5 nov. 2010.

FONG, W. G. et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. **Genomics**, v. 70, n. 1, p.113-122, 2000.

FUKUDA, S.; PELUS, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. **Mol Cancer Ther.**, v. 5, n. 5, p.1087-1098, 2006.

FULDA, S. et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. **Nature Medicine**, v. 8, n. 8, p.808-815, 15 jul. 2002.

FURUMOTO, K. et al. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology.**, v. 33, n. 1, p.189-195, jan. 2001.

GABRIELY, G. et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 17, p.5369-5380, set. 2008.

GANESAN, S. et al. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. **Respir Res.**, v. 11:131, 28 set. 2010.

GARCÍA MEDIERO, J. M. et al. Efecto de polifenoles de la dieta mediterránea sobre la proliferación y mediadores de la invasividad "in vitro" de la línea de cáncer vesical murino MB-49. **Actas Urol Esp.**, v. 29, n. 8, p.743-749, 2005.

HAI, X. et al. In-capillary screening of matrix metalloproteinase inhibitors by electrophoretically mediated microanalysis with fluorescence detection. **Anal Chem.**, v. 83, n. 1, p.425-430, 1 jan. 2011.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2179-2205, 2007.

HERTOG, M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p.1007-1011, 23 out. 1993.

HERTOG, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Arch Intern Med**, v. 155, n. 4, p.381-386, fev. 1995.

HOLLMAN, P. C. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res**, v. 6, p.569-573, 31 dez. 1999.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother**, v. 51, n. 8, p.305-310, set. 1997

HOSHI, M. et al. Antitumoral effects of defective herpes simplex virus-mediated transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene in malignant glioma U87 in vitro: consequences for anti-cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther.**, v. 7, n. 5, p.799-805, 2000.

HULLEMAN, E.; HELIN, K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. **Adv Cancer Res**, v. 94, p.1-27, 2005.

HWANG, M. K. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: its direct inhibition by quercetin. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 41, n. 7, p.1592-1600, jul. 2009.

JACOMASSO, T. **Caracterização do perfil de expressão de MMPs e de seus inibidores, TIMPs e RECK, em linhagens representativas dos diferentes estágios de progressão do melanoma humano.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

JAGTAP, S. et al. Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases. **Curr Med**

**Chem**, v. 16, n. 12, p.1451-1462, 2009.

JAKUBOWICZ-GIL, J. et al. Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. **Chem Biol Interact.**, v. 188, n. 1, p.190-203, 6 out. 2010.

JEONG, J. H. et al. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **J Cell Biochem.**, v. 106, n. 1, p.73-82, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAJIWARA, Y. et al. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. **Cancer.**, v. 97, n. 4, p.1077-1083, 2003.

KARIN, M. et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p.301-310, abr. 2002.

KATZ, A.; MALUF, F. C.; BUZAID, A. C. K. Gliomas no Adulto. In: KATZ, A.; MALUF, F. C.; BUZAID, A. C. **Manual de Oncologia Clínica do Hospital Sírio Libanes**. São Paulo: Dendrix, 2008. On-Line. Disponível em: <<http://www.mochsl.com.br/>>. Acesso em: 02 fev. 2010.

KIM, D. et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J.**, v. 15, n. 11, p.1953-1962, set. 2001.

KIM, E. J. et al. Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. **Neurochem Res.**, v. 33, n. 6, p.971-979, 2008.

KIM, H. J. et al. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. **J Agric Food Chem.**, v. 58, n. 11, p.8643-8650, 11 ago. 2010.

KNEKT, P. et al. Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 3, p.223-230, 1 ago. 1997.

KONG, C. S. et al. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p.1742-1748, 2008.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol Cancer**, v. 135, n. 9, p.1-14, 1 jun. 2010.

KRAWCZYK, A.; JAWORSKA-ADAMU, J. Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 48, n. 2, p.173-177, jan. 2010

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal Biochem**, v. 182, n. 1, p.16-19, out. 1989.

LAKKA, S. S.; GONDI, C. S.; RAO, J. S. Proteases and glioma angiogenesis. **Brain Pathol.**, v. 14, n. 4, p.327-341, 2005.

LE MARCHAND L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. **Biomed Pharmacother.**, v. 56, n. 6, p.296-301, 2002.

LEE, H. et al. TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. **J Cell Biochem**, v. 104, n. 3, p.1065-1074, 1 jun. 2008.

LEE, J. K. et al. Quercetin reduces the elevated matrix metalloproteinases-9 level and improves functional outcome after cerebral focal ischemia in rats. **Acta Neurochir (Wien)**, publicado on-line: 1 dez. 2010.

LEVICAR, N.; NUTALL, R. K.; LAH, T. T. Proteases in brain tumor progression. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 145, n. 9, p.825-838, 2003.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p.329-333, 2007.

LIMA, M. T. et al. Isolation and characterization of three novel isoforms of the *RECK* tumor suppressor gene. In: **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Águas de Lindóia, 2009.

LIN, C. W. et al. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC $\delta$ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 9, p.1807-1815, 2008.

LIU, Y. et al. Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids. **J Altern Complement Med**, v. 9, n. 5, p.631-640, out. 2003.

LOA, J.; CHOW, P.; ZHANG, K. Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, Blá, v. 63, n. 6, p.1007-1016, maio 2009.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, v. 4, n. 114, p.97-109, 6 jul. 2007.

LUKES, A. et al. Extracellular Matrix Degradation by Metalloproteinases and Central Nervous System Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 19, n. 3, p.267-284, 1999.

MAHER, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & Dev.** vol. 15, p.1311–1333. 2001.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 1, p.230S-242S, jan. 2005.

MASUI, T. et al. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Cancer Res.**, v. 9, n. 5, p.1779-1784, maio 2003.

MCLENDON, R. et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p.1061-1068, 23 out. 2008.

MENDOZA-WILSON, A. M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 681, n. 1-3, p.71-76, 26 jun. 2004.

MENG, N. et al. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, p.1003-1010, 2008.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 1, p.49-58, fev. 2003.

MIN, K.; EBELER, S. E. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 11, p.2716-2722, nov. 2009.

MINNITI, G. et al. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 12, p.5171-5184, 2009.

MOON, Y. J. et al. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm Drug Dispos**, v. 29, n. 4, p.205-217, 29 maio 2008.

MORROW, D.M.P. et al. Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation. **Mutation Research**, v. 480-481, p.269-276, 2001.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Biophys**, v. 417, n. 1, p.12-17, 1 set. 2003.

MYHRSTAD, M. C. et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. **Free Radic Biol Med.**, v. 32, n. 5, p.386-393, 1 mar. 2002.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, 562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NAJMAN, H.; GADELHA, M. I. P. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia**. vol. 48, n. 3, p.439-455, 2002.

NAKADA, M. et al. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. **J Neurosurg.**, v. 94, n. 3, p.464-473, 2001.

NAKADA, M.; OKADA, Y.; YAMASHITA, J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. **Frontiers In Bioscience**, v. 8, n. 1, p.e261-269, 2003.

NAKAMURA, H. et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. **Cancer Res.**, v. 59, n. 2, p.467-473, 1999.

NASSER, J. A. et al. Transcriptional analysis of TIMP-1 and NM23-H1 genes in glioma cell invasion. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 64, n. 3B, p.774-780, 2006.

NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY. Disponível em: <<http://www.braintumor.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Freeman, 2005. 1119 p.

NÉMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **Eur J Nutr**, v. 42, n. 1, p.29-42, jan. 2003.

NODA, M. et al. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 2-3, p.167-175, 2003.



NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 11, p.1659-1665, 2007.

NOJIMA, H. et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. **J Biol Chem**, v. 278, n. 18, p.15461-15464, 2 maio 2003.

OH, J. et al. The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. **Cell**, v. 107, p.789-800, 2001.

OHGAKI, H. Epidemiology of Brain Tumors. In: VERMA, M. (Comp.). **Methods of Molecular Biology: Cancer Epidemiology**. Totowa: Humana Press, 2009. Cap. 14, p. 323-342.

OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G.; GRANT, M. H. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma. **Xenobiotica**, v. 32, n. 4, p.279-287, abr. 2002.

OMURA, A. et al. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. **J Biol Chem**, v. 284, n. 6, p-3461-3469, 6 fev. 2009.

PARK, J. B.; KWAK, H. J.; LEE, S. H.. Role of hyaluronan in glioma invasion. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 3, p.202-207, 2008.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Scien**, v. 455, n. 7216, p.1807-1812, 26 set. 2008.

PLANCHENAUT, T. et al. Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion. **Neurosci Lett.**, v. 299, n. 1-2, p.140-144, 2001.

POINCLOUX, R.; LIZÁRRAGA, F.; CHAVRIER, P.. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. **J Cell Sci.**, v. 122, n. 17, p.3015-3024, 2009.

POTÉN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 4, n. 74, p.465-486, 1968.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 346-359, 2008.

RANGEL-ORDÓÑEZ, L. et al. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba Extract EGb 761(R). **Planta Med**, publicado on-line, 19 maio 2010.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer.**, v. 3, n. 7, p.489-501, 2003.

RIMM, E. B. et al. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals Of Internal Medicine**, v. 125, n. 5, p.384-389, 1 set. 1996.

SANES, J. R.. Extracellular Matrix Molecules that Influence Neural Development. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 12, p.491-516, 1989.

SARAGUSTI, A. C. et al. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of the flavonoid-enzyme interaction. **Eur J Pharmacol.**, v. 644, n. 1-3, p.138-145, 10 out. 2010.

SASAHARA, R. M. et al. Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 7, p.891-895, jul. 1999b.

SASAHARA, R. M. et al. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev.**, v. 26, n. 6, p.435-443, 2002.

SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, n. 3, p.668-675, 2 nov. 1999a.

SESTILI, P. et al. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. **Free Radic Biol Med.**, v. 25, n. 2, p.196-200, 15 jul. 1998.

SHAMSARA, J. et al. Association between MGMT promoter hypermethylation and p53 mutation in glioblastoma. **Cancer Invest.** v. 27, n. 8, p. 825-829, out. 2009.

SHIMADA, T. et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. **Clin Exp Metastasis.**, v. 18, n. 2, p.179-188, 2000.

SILVA, M. M. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radic Res**, v. 36, n. 11, p.1219-1227, nov. 2002.

SIMIZU, S. et al. RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. **Cancer Res.**, v. 65, n. 16, p.7455-7461, 2005.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matriz Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p.463-516, 2001.

STRONGIN, A. Y. et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p.5331-5338, 1995.

STUPP, R et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p.459-466, maio 2009.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p.987-996, 10 mar. 2005.

SUH, D. K. et al. Induction of G(1)/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells. **Arch Pharm Res.**, v. 33, n. 5, p.781-785, mai. 2010.

TAIAYB, A.; SREEDHAR, A. S.; RAO, Ch. M. Hsp90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma. **Biochem Pharmacol.**, v. 78, n. 2, p.142-152, 15 jul. 2009.

TAKAHASHI, C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p.13221-13226, 1998.

TAKENAKA, K. et al. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung câncer. **Eur J Cancer.**, v. 40, n. 10, p.1617-1623, jul. 2004.

TAMM, I. et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. **Clin Cancer Res.**, v. 6, n. 5, p.1796-1803, 2000.

TASHIRO, E.; TSUCHIYA, A.; IMOTO, M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 5, p.629-635, mai. 2007.

THANGASAMY, T. et al. Quercetin selectively inhibits bio-reduction and enhances apoptosis in melanoma cells that overexpress tyrosinase. **Nutr Cancer.**, v. 59, n. 2, p.258-268, 2007.

THANGASAMY, T. et al. Tyrosinase overexpression promotes ATM-dependent p53 phosphorylation by quercetin and sensitizes melanoma cells to dacarbazine. **Cell Oncol.**, v. 30, n. 5, p.371-387, 2008.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p.1-2, 18 jun. 2001.

VARGAS, A. J.; BURD, R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. **Nutr Rev**, v. 68, n. 7, p.418-428, jul. 2010.

VIJAYABABU et al. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). **Mol Cell Biochem**, v. 278, n. 1-2, p. 109-116, 2006.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, p. 827-839, 2003.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, p. 2123-2133, 2000.

WALLE, T.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **J Nutr**, v. 131, n. 10, p.2648-2652, out. 2001.

WANG, H. et al. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. **Lab Invest**, v. 84, n. 8, p.941-951, ago. 2004.

WÄTJEN, W. et al. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. **J Nutr.**, v. 135, n. 3, p.525-531, mar. 2005.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WELLER, M. et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? **Nature Reviews Neurology**, v. 6, p.39-51, jan. 2010.

WELM, B.; MOTT, J.; WERB, Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. **Curr Biol.**, v. 12, n. 6, p.R209-211, 2002.

WILLIAMSON, G. et al. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. **Free Radic Res**, v. 39, n. 5, p.457-469, maio 2005.

WIMAN, K G. The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. **Faseb J**, v. 7, n. 10, p.841-845, jul. 1993.

WINNISCHOFER, S. M. B. **Caracterização do envolvimento do gene RECK na proliferação celular e progressão tumoral: inversa correlação com a expressão do oncogene c-myc**. 152 f. Tese (Doutoramento) - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

YANG, J. et al. Effect of high glucose on PKC and MMPs/TIMPs in human mesangial cells. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.**, v. 34, n. 5, p.425-431, 2009.

YODIM, K. A. et al. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 5, p.592-604, 1 mar. 2004.

ZAMIN, L. L. et al. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Cancer Sci**, v. 100, n. 9, p.1655-1662, 12 maio 2009.

ZHANG, F.; CUI, Y.; CAO, P. Effect of quercetin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma HEN1 cells. **J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci**, v. 28, n. 3, p.369-372, 2008.

ZHANG, X. M.; HUANG, S. P.; XU, Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 53, n. 1, p.82-88, 2004.